

國立臺灣大學生命科學院生化科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemical Sciences

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

探討Rhotekin基因於癌症病變過程中所扮演的角色

To study the oncogenic role of Rhotekin,

a RhoGTPase effector

彭文欣

Wen-Hsin Peng

指導教授：黃銓珍 博士

張久瑗 博士

Advisor: Chang-Jen Huang Ph.D.

Jeou-Yuan Chen Ph.D.

中華民國 97 年 7 月

July, 2008

國立臺灣大學（碩）博士學位論文
口試委員會審定書

探討 Rhotekin 基因於癌症病變過程中所扮演的角色

To study the oncogenic role of Rhotekin,
a RhoGTPase effector

本論文係 彭文欣 (R95B46012) 在國立臺灣大學生化科學研究所完成之碩（博）士學位論文，於民國 97 年 07 月 03 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

 陈玉山 (簽名)

 張久綏 (召集人)

 黃金池 (指導教授)

致謝

終於，走到了今天，兩年的研究所生涯結束了。

回想當初大四時，我還是個懵懵懂懂對於實驗一竅不通的大學生，感謝張久瑗博士收我為暑期生，讓我有機會接觸並學習到研究領域的博大精深，並選擇了念研究所的這條路；順利推甄上台大生化所後，感謝我的指導教授黃銓珍博士以及張久瑗博士，兩位老師在實驗上以及課業上的諄諄教誨、指點迷津，讓我獲益良多。

感謝 Rm507 的夥伴們，在這 3 年裡忍受我的吵鬧與任性；感謝在我剛進實驗室時帶我做實驗的梅榮學姊、欣梅學姊以及兒芳學姊，陪我嬉鬧的毅奇學長、宇徵學長以及玉玲學姊，幫我解惑的佳霖學長、瑞華學長，總是作好吃的東西很會照顧人的雅文學姊，和我說心事的奐妤學姊和秀亭學姊，很愛欺負人的阿福和惠儀，短暫相處卻很疼我的淑貞學姊，非常好笑的漢民學弟。有了你們，我才有采多姿的實驗室生活。

感謝 R95 的同學們，在碩一時感謝你們陪伴我走過低潮，很開心上了研究所還能碰到一群這麼棒的你們，還能交到知心的朋友，雖然我孤立在生醫所，但是任何活動你們總是會想到我，有了你們，我才有采多姿的研究所生活。

感謝我的爸媽，感謝你們讓我繼續唸書，讓我去我想做的事，感謝你們體諒我這 2 年的忙碌，有了你們，我才能拖著一身的疲憊回到一個可以放鬆的家。

感謝在這 2 年內我所碰到的每一個人。

雖然繞了段遠路，終究走到了結果。

最後，謹以此文獻給我最愛的外婆。

目 錄

項目	頁碼
目錄	I
圖目錄	IV
縮寫表	VI
中文摘要	VII
英文摘要	VIII
第一章 緒論	1
第一節 胃癌之簡介	1
第二節 癌症之生成	5
第三節 Rhotekin(RTKN)	10
第二章 研究目標	12
第三章 材料與方法	13
第一節 細胞培養 (Cell culture)	13
第二節 西方墨點轉濱分析 (Western blot)	14
第三節 轉染反應 (Transfection)	15
第四節 製備穩定細胞株 (stable clone)	16
第五節 免疫螢光染色 (Immunofluorescence stain)	17

第六節 細胞飽和度測試	18
第七節 細胞增生分析 (WST-1 assay)	18
第八節 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)	19
第九節 基質金屬酶(MMP)酶譜法 (Zymography)	20
第十節 細胞遷移與入侵能力測試 (Migration and Invasion assay)	21
第十一節 洋菜軟膠方法(Soft agar assay)分析非固著依賴性細胞生長(Anchorage-independent growth assay, AIG)	22
第四章 結果	24
第一節 探討 RTKN 對細胞轉型之影響	24
(一) 過度表現 RTKN 使細胞喪失接觸性抑制(contact inhibition of growth)而造成細胞飽和度增加	24
(二) 過度表現 RTKN 對於細胞生長速率之影響	25
(三) 過度表現 RTKN 使細胞型態改變	26
(四) 過度表現 RTKN 對細胞骨架之影響	27
(五) 過度表現 RTKN 增加細胞遷移(Migration)及細胞入侵(Invasion)之能力	28
(六) 分析 RTKN 穩定細胞株中 MMP 之含量及活性	29
(七) 細胞過度表現 RTKN 促進其非固著性依賴生長(anchorage-independent growth)之能力	30
第二節 探討胃癌細胞中 RTKN 的含量對細胞轉型之影響	31
(一) 於 AZ-521 胃癌細胞株中過度表現 RTKN	31
(二) 於 NUGC-3 胃癌細胞株中剔除 RTKN 之表現	32
第五章 討論	34

第一節 探討 RTKN 促使細胞飽和度增加	34
第二節 探討 RTKN 使細胞型態改變並且造成細胞骨架之重整	35
第三節 探討 RTKN 增加細胞遷移 (Migration)及細胞入侵 (Invasion)之能力	36
第四節 探討 RTKN 促進細胞非固著性依賴生長 (Anchorage-independent growth)之能力	38
參考文獻	40
圖	46
附錄	67
附表一、本研究所使用之質體 DNA	67
附表二、H1299/RTKN 穩定表現細胞株之特性	68
附圖一、RTKN過度表現不影響組成粘著斑蛋白質之表現	69
附圖二、Boyden chamber 結構示意圖	70

圖 目 錄

圖一、	各細胞株中內生性 RTKN 之含量	46
圖二、	過度表現 RTKN 造成細胞喪失接觸性抑制 (lost of contact inhibition of movement)	47
圖三、	過度表現 RTKN 使細胞飽和度增加	48
圖四、	RTKN 對於細胞生長速率之影響	49
圖五、	RTKN 過度表現造成纖維狀肌動蛋白 (F-actin)含量減少及降低 應力纖維 (stress fiber)的生成	50
圖六、	RTKN 過度表現抑制粘著斑 (focal adhesion)之形成	51
圖七、	穩定表現 RTKN 之 H1299 細胞株，並測量各細胞株中 RTKN 之表現量	52
圖八、	過度表現 RTKN 所引起之細胞型態改變以及細胞骨架重整	53
圖九、	過度表現 RTKN 增加 H1299 細胞遷移 (Migration)之能力	56
圖十、	過度表現 RTKN 增加 H1299 細胞入侵 (Invasion)之能力	57
圖十一、	H1299/RTKN 穩定細胞株中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 之表現情形	58
圖十二、	Zymography (Gelatin)分析 H1299/RTKN 穩定細胞株中 MMP-2 和 MMP-9 之活性	59
圖十三、	過度表現 RTKN 可增加 H1299 細胞株在洋菜軟膠培養基上之非依賴性固著生長	60
圖十四、	AZ-521 及 NUGC-3 穩定細胞株 (stable clone)中 RTKN 之表現量	61
圖十五、	胃癌細胞株中 RTKN 含量改變影響細胞遷移 (Migration)之能力	62

圖十六、 胃癌細胞株中 RTKN 含量改變影響細胞入侵 (Invasion)之能力 63

圖十七、 AZ-521 及 NUGC-3 穩定細胞株中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 之表現情形 64

圖十八、 Zymography (Gelatin)分析 AZ-521 及 NUGC-3 穩定細胞株中 MMP-2 和 MMP-9 之活性 65

圖十九、 抑制內生性之 RTKN 會減少細胞在洋菜軟膠培養基上長出的聚落數目 66



縮寫表

Bis-Acrylamide : N,N-methylenediacrylamide

BSA : bovine serum albumin

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA : deoxyribonucleic acid

DTT : dithiothreitol

ECM : extracellular matrix

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

G418 : geneticin

HA : hemagglutinin

HRP : horseradish peroxidase

kDa : kilodalton

LB : luria-Bertani

LF : lipofectamine

mRNA : messenger RNA

PBS : phosphate-buffer saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PH : pleckstrin homology domain

PVDF : Polyvinylidene fluoride

RBD : Rho binding domain

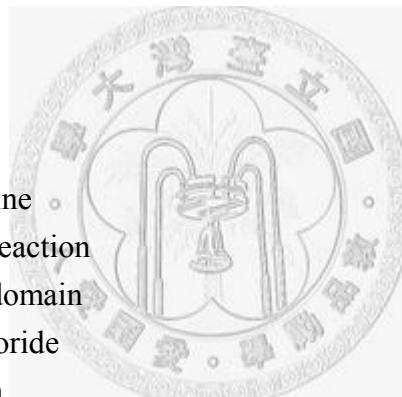
RTKN : Rhotekin

SDS-PAGE : sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SH3 domain : Src homology 3 domain

TEMED : N,N,N,N-tetramethylethylenediamine

WST-1 : WST-1(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate



中文摘要

胃癌全球罹患率與致死率皆高居癌症的第二位，但我們對胃癌之致病機轉了解仍有限。實驗室以差異性表現分析，發現 Rhotekin (RTKN) 蛋白在胃癌組織中表現量高於週邊正常組織。目前對於 RTKN 的功能研究知道其會和 Rho 、 Tax interacting protein-1 一起促進 serum response elememt 的活化，而我們實驗室之前則發現有 RTKN 大量表現的細胞具有抗凋亡的能力可能是因 RTKN 影響 NF- κ B 的活性，另外也發現 RTKN 降低了 RhoA 下游 ROCK 的活性並造成 Rac 活性上升而影響細胞骨架的重整，減少 stress fiber 生成並增加細胞 surface protrusion 和移動的能力。在本論文中，我們進一步探討 RTKN 在細胞轉型(cell transformation) 及遷移(migration)過程中所扮演的角色。我們根據細胞株中所擁有 RTKN 的表現量挑選出合適的細胞株，分別在低表現量的細胞株(H1299, AZ-521)內大量表現 RTKN 以及在高表現量的細胞株(NUGC-3)內利用 sh-RNA 專一性抑制內生性的 RTKN 之表現。初步發現，過度表現 RTKN 使得細胞喪失接觸性抑制(contact inhibition of growth)而造成細胞飽和度增加，促使細胞骨架重整造成細胞型態改變，增加細胞遷移(Migration)及細胞入侵(Invasion)之能力，並且發現細胞過度表現 RTKN 促進其非固著性依賴生長(anchorage-independent growth)之能力。這些現象說明了 RTKN 參與了細胞轉型(transformation)及遷移(migration)，因此可能與胃癌生成以及轉移惡化有關。

我們藉由本研究之分析 RTKN 所給予細胞轉型之特性，建議 RTKN 於胃癌生成或惡化中扮演一重要的角色及可能之機制。

關鍵詞:癌症 細胞轉型 細胞遷移 細胞入侵 非固著性依賴生長

Abstract

Gastric cancer is ranked the fourth common cancer and the second leading cause of cancer death worldwide (almost 1 million deaths/year). Using ordered differential display, we have identified *rhotekin*, the gene encoding Rho effector rhotekin (RTKN) as one of the genes overexpressed in human gastric cancer. To further understand the role of Rho/RTKN involved in the pathogenic development of GC, in this study, we propose to dissect Rho signaling pathways that are mediated by RTKN, and special efforts will be focused on the ones contribute to malignant transformation and tumor metastasis. To assess the function of RTKN in cellular transformation, we ectopically expressed RTKN in cultured cell, and monitored the biological readouts of RTKN expression. The data shown, RTKN expression suppressed contact inhibition of movement in both H1299 as well as HEK293 cells. RTKN In consistence, overexpression of RTKN conferred an increased saturation density in H1299 cells. Overexpression induced extensive cell surface protrusions with a concomitant decrease of stress fibers and focal adhesions. We have further generated stable clones : H1299 and AZ-521, RTKN low expresser that stably expressed RTKN, and NUGC-3 , RTKN high expresser that stably knock downed RTKN, and tested for transforming activity. The stable clone displayed increased migration and invasion ability when compared to the parental cells. In addition, the stable clone developed anchorage-independent growth in soft agar whereas the parental cells showed reduced growth in soft agar. Taken together, we conclude that overexpression of RTKN may promote cell transformation and cell migration, and thus and thus contribute to tumor metastasis.

Key words: cancer cell transformation cell migration cell invasion

anchorage-independent growth

第一章 緒論

第一節 胃癌之簡介

(一) 流行病學

胃癌為高患率癌症之一，其全球致死率高居癌症死亡第二位(Coleman *et al.*, 1993)；台灣地區根據民國 96 年度行政院衛生署的統計，96 年國人因癌症死亡人數為 40,306 人，占所有死亡人數的 28.9%，標準化死亡率為每十萬人口 142.6 人，較上年增加 2.4%。胃癌為台灣癌症死因的第五位，死亡百分比占 6.1%，其中在男性十大癌症死因排名第五，女性十大癌症死因則排名第六(行政院衛生署)。胃癌罹患率有很明顯的地區性差異，日本、中國、俄羅斯為高罹患率國家，以日本為例，其胃癌年罹患率十萬人中約有八十個病例，遠高於罹患率低的美國，十萬人中僅有十個病例(Macdonald, 2006)。



(二) 危險因子

容易罹患胃癌的相關危險因子包括遺傳因素、相關病史如惡性貧血和慢性萎縮性胃炎、飲食習慣、吸煙及酗酒等(Gonzalez *et al.*, 2002)，其中飲食習慣是相當重要的一項。在胃癌高危險地區的人們通常有下列飲食特性：高鹽飲食、動物脂肪和蛋白質攝食少、攝食大量由穀類及塊莖地下根食物轉化而來的碳氫化合物 (complex carbohydrates)、攝食大量硝酸鹽及綠色葉類以及水果攝食不足。由動物實驗發現若是以亞硝酸鹽類 N-methyl-N-nitroso-N-nitroso-guanidine (MNNG) 長期餵養老鼠，則會使其產生胃癌；食物經過醃漬或醃燻後會產生硝酸鹽類的衍生物，這些衍生物的構造和 MNNG 極為類似，可能是飲食致癌的原因之一。除了飲食因子之外，幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 感染是近十年廣受矚目的一項胃癌危險因子，其會經由刺激胃壁細胞大量增生、干擾細胞抗氧化功能、增加活

性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 含量導致細胞內 DNA受氧化性傷害而增加胃壁細胞癌化機會(Talley *et al.*, 2008)；不過，並非所有幽門螺旋桿菌感染者皆罹患胃癌，故除了幽門螺旋桿菌以外，可能必須有其他因子參與才足以使幽門螺旋桿菌感染者發生胃癌。

(三) 分類

胃壁由內而外分為四層基本構造：黏膜層 (mucosa layer)、黏膜下層 (submucosa layer)、肌肉外層 (muscularis external) 以及漿膜層 (serosa layer)。黏膜層是由最內面的粘膜上皮細胞層及其下的粘膜固有層所組成，包含有多種腺體可分泌胃酸及胃蛋白酵素。由胃黏膜腺體細胞長出的腺癌 (adenocarcinomas) 佔了惡性胃瘤 90%~95%，因此一般通稱之胃癌指的就是胃腺癌，其餘則包括有淋巴瘤 (lymphomas)、間質瘤 (stromal tumors) 以及其他罕見腫瘤像是胃類癌 (gastric carcinoids) (Master, 2004) 等。依據組織病理的特徵，Lauren 在 1965 年提出的分類法將胃腺癌 (gastric adenocarcinoma) 大致區分為腸型 (intestinal type) 和瀰漫型 (diffuse types) 兩種 (Ming, 1977)。腸型之胃癌屬於高度分化 (well-differentiated) 的胃癌，此型態之胃癌較為普遍且以男性及年齡大的病患居多，這種腺癌的發生大部分是受到環境因子所影響，而且通常在發生之前病患都會出現慢性胃炎 (chronic gastritis) 或是延長的癌前狀態 (prolonged precancerous state) 包括 metaplasia 和 dysplasia 的階段；而分化較差 (poorly-differentiated) 的瀰漫型則被認為是區域性 (endemic)，發生率較低而患者以女性和年輕人較普遍，且其發生則認為較有可能受到遺傳因子的影響，由於缺乏癌前病變 (precancerous lesion)，所以在診斷上比腸型腺癌困難 (Master, 2004)。

(四) 診斷

在診斷罹患胃癌時最常發現的兩種病徵為體重減輕和腹部疼痛，有些病人會

出現噁心 (nausea) , 嘔吐 (vomiting) 以及合併有消化不良 (non-specific dyspepsia) 的情形。如果腫瘤的位置是在胃食道連接部 (gastroesophageal junction) 則可能造成吞嚥困難 (dysphagia) 和吞嚥疼痛 (odynophagia) , 如果腫瘤的位置是在靠近幽門 (pylorus) 地方則可能會有胃出口阻塞 (gastric outlet obstruction) 的情形發生。將近 20%的病人會有嘔血 (hematemesis) 和黑便 (melena) 症狀。上消化道內視鏡 (upper GI endoscopy) 是最基本用來診斷胃癌的方法，雖然此法與上消化道鋇劑 X 光攝影 (UGI Barium radiography) 比較是具侵入性並且較昂貴，但敏感度和專一性都比較好。

在臨牀上，腫瘤分期 (stage) 的判斷在決定治療方法上扮演重要角色，最常用來做為胃癌分期的系統是由 American Joint Committee on Cancer 所建立的 TNM 分期系統，包含了腫瘤侵犯深度 (T; depth of tumor invasion) , 淋巴腺轉移 (N; nodal stage) 以及遠處轉移 (M; distant metastases) 的判斷；其中腫瘤侵犯深度依癌細胞浸潤胃壁的深度，又分 T1~T4 不同等級；淋巴腺轉移程度，則依是否近距離 (3 cm) 內淋巴腺轉移與否的情形，分為 N0~N2；另外則以 M0 及 M1 代表有無遠端轉移 (Greene *et al.*, 2002)；再依不同的 TNM 組合分為第一期至第四期；一般而言，臨牀上大致觀察到越晚期的病患其存活率越差，第一期至第四期病患的五年存活率約為 60% , 30% , 10% , 及 <5% (Wanebo *et al.*, 1993)。

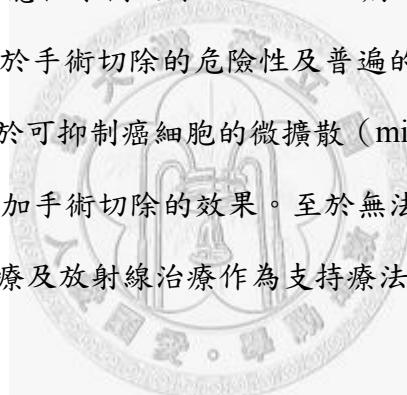
(五) 轉移

胃癌的擴散方式有四種：經淋巴管、微血管、腹膜以及直接侵犯。其中以經淋巴管以及微血管較常見。胃癌的擴散與其侵犯深度有關，當胃癌組織尚侷限於粘膜上皮層時，通常還不會侵入微血管或淋巴管，故很少引起轉移。但一旦進入粘膜固有層，這種機會就會提高，而引起局部淋巴轉移，或遠處轉移。一般而言，胃癌若侵入淋巴管，會先轉移到局部淋巴結，再經胸管，進入左頸下部淋巴結。若侵入微血管，則隨著血流，先轉移到肝臟，再由肝臟轉到肺、骨、腦等其它器官。若胃癌穿過整個胃壁時，就有可能直接侵犯到周圍器官，如：胰臟、橫結腸、肝臟、橫膈及脾臟等。若胃癌位於贲門區或幽門前竇部，

則可能直接侵犯食道或十二指腸(Chipponi *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2007)。

(六) 治療

胃癌之預後情形不佳，其五年存活機率通常不大於 20%(Neugut *et al.*, 1996)，尤其在胃癌高發生率的地區更是如此。主要原因是大部分患者在診斷出胃癌疾病時，已達末期胃癌；目前胃癌的首要處理方式仍是以治癒性手術切除為主，但術後病患之五年存活率乃視其發現罹病時的癌症級別而定。一般而言，原發性早期胃癌在進行手術切除後會有較高的存活機會，若在術後並行化療及放射線療法，五年存活率可提高至 50%。不過，由於胃癌症狀隱匿，早期發現不易，所以約只有 30-35%的病患可接受治癒性手術切除，而 50-70%病人則無法以手術切除或僅能施行改善性手術治療。基於手術切除的危險性及普遍的低預後情形，術前化療的應用漸被採納，其優點在於可抑制癌細胞的微擴散 (micrometastases)、降低胃癌級別 (downstaging) 以增加手術切除的效果。至於無法採用治癒性手術切除的胃癌病患，此時只能採用化療及放射線治療作為支持療法。



(七) 致病機轉

從正常的胃黏膜細胞經病變成為癌細胞的產生，乃是一個多因子多步驟的癌化過程 (multifactorial multistep carcinogenesis)。不過，不同時期或不同發生部位的胃癌之病理特徵差異性相當大，推論其可能的致病機轉也各不相同。目前在胃癌的致病分子機轉方面的研究結果顯示，致癌基因（如*K-RAS*、*KSAM*、*ERBB2*、*MET*）的高度表現、抑癌基因（如*p53*、*APC*）的突變、細胞週期調節基因(*CCNE*)、腫瘤轉移侵犯相關基因(*CD44*)以及DNA錯配修補基因(*hMLH1*)的不正常表現等，皆被認為與胃癌的致病過程有所關連。究竟前述種種危險因子是透過何種機轉促成癌症發生，及其於胃癌發生過程中與各核內基因（致癌基因、抑癌基因、瘤轉移侵犯相關基因、DNA 錯配修補基因等）的交互作用、各自角色為何，仍是目前

醫學界深入研究中的重要課題(Catalano *et al.*, 2005)。

胃癌是一個高死亡率、預後不佳且易轉移的癌症，受限於胃癌早期症狀不明顯很難診斷出來，使其臨床治療效果有限，統計也指出胃癌存活率隨著診斷出腫瘤分期越晚有明顯降低的情形，因此研究胃癌致病或轉移機轉，找尋能作為早期診斷的分子標記將會對於胃癌的早期發現、治療以及減少胃癌致死率有很大的幫助。

第二節 癌症之生成

細胞在多重基因改變(multiple genetic alternation)下，失去對生長的正常調控，導致異常增生，即稱為腫瘤(tumor)。腫瘤依其分部及擴散與否可分為良性腫瘤(benign tumor)和惡性腫瘤(malignant tumor, 亦稱為癌症, cancer)，前者生長緩慢，與周圍組織界限清楚，不發生轉移，後者生長迅速，可經由血液或淋巴轉移到身體其他部位且威脅生命(Klafter and Arbiser, 2000; Lewis, 2007)。造成癌症生成的分子變化很多，一種是當致癌基因(oncogene)被活化(gain of function)使細胞失控而快速增長，另一種則是抑癌基因(tumor suppressor)喪失功能(lost of function)，使細胞無法修復DNA的斷裂或喪失引發細胞凋亡(apoptosis)的能力，逐步將正常細胞轉型成腫瘤細胞，甚至進一步轉變為具有入侵及轉移特性之惡性腫瘤(Bloemena, 2008; Fearon and Dang, 1999; Funato, 1999; Klein, 1988; Lundquist, 2006; Sato *et al.*, 1989)。

(一) 致癌基因(oncogenes)

致癌基因(oncogenes)在細胞內主要調控細胞增殖相關的基因，如生長因子(growth factor)、生長因子受體(growth factor receptor)(Lee *et al.*, 2008)、細胞週期

蛋白(cell cycle protein)、細胞凋亡調控因子(anti-apoptosis factor)等，致癌基因之活化可能經由下列各種不同形式的基因變異：定點突變(point-mutation)、刪除(deletion)、染色體移位(chromosome translocation)、DNA 重排(DNA rearrangement)、和增幅(amplification)等，造成原癌基因之結構或調控區發生變異、基因產物增多或活性增強，因此加速細胞週期進行，並促使細胞過度增殖，從而形成腫瘤(Funato, 1999)。

(二) 抑癌基因(tumor suppressor)

抑癌基因的產物具有抑制細胞細胞不正常增生、促進細胞分化以及抑制細胞遷移等負調控作用，可經由抑制細胞週期進行，進而抑制細胞不正常增生，主要包括：(1)轉錄調節因子，如Rb、p53；(2)負調控轉錄因子，如WT；(3)週期蛋白依賴性激酶抑制因子(CKI)，如p15、p16、p21；(4)訊息傳遞的抑制因子，如磷脂酶(PTEN)；(5)DNA修復因子(DNA repair factor)，如BRCA1、BRCA2[12]等，因此若由於突變、染色體喪失(deletion)或基因外(epigenetic)之改變(如promoter hypermethylation)(Domann and Futscher, 2004)等，導致抑癌基因失去正常功能、表現量降低或基因黙化(gene silencing)，則會導致細胞增生，進而促使腫瘤生成(Fearon and Dang, 1999; Klein, 1988)。

(三) 癌細胞之特性

癌細胞還有許多不同於正常細胞的生理、生化和形態特徵，在型態上：癌細胞大小不一，通常比它的來源細胞(parental cell)體積要大，核質比例則顯著高於正常細胞，並可能出現巨核、雙核或多核現象；核內染色體呈非整倍態(aneuploidy)，且染色體可能有缺失或增加；癌細胞骨架組裝不正常且細胞表面可能產生腫瘤相關抗體(tumor associated antigen)等(Becker, 2009; Geiger *et al.*, 2001; Heber and ScienceDirect, ; Lewis, 2007)。

(四) 癌細胞之惡性轉型作用(neoplastic transformation)

細胞轉型的機制主要可區分為三個階段：起始(initiation)、促進(promotion)以及進展(progression)。正常細胞在受到致癌物質刺激而導致基因發生改變，往往只需要 1-2 天的時間，將化學性的致癌物質(ex: polycyclic hydrocarbon) 塗抹在老鼠皮膚表面會造成細胞內 Ras 的活化，此即為細胞轉型的第一階段：起始期(initiation)，此時正常細胞就轉變為癌的初始細胞(initiated cells)，此步驟為不可逆並且在外觀上是無法察覺的。細胞轉型的第二階段：促進期(promotion)，例如我們可以使用 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) 在同一區域塗抹會促使 Ras 活化的細胞群增生，造成此一族群的細胞擴展(clonal expansion)，此步驟可能在起始後的一年才發生，為一可逆且時序很長的時期需要約 10 年以上的時間過程，才能將初始細胞變成癌前期細胞 (preneoplastic cell)，包括一些致癌基因及抑癌基因的變化累積而成，因此成為瞭解及延緩癌化進程的重要時段。這期間基因還要累積一些序列性的變化，稱為進展期(progression)。癌的前期細胞，還需要數年的光景，才會進行演變成癌細胞(neoplastic cell)(Weinberg, 2007)。

癌細胞惡性轉型包含下列六種改變(Hanahan and Weinberg, 2000)：

(1)自足的生長訊息(self-sufficiency in growth signals):一般正常細胞需要促進細胞分裂之訊息(mitogenic growth signals, GS)，使細胞由靜息狀態(quiescent state)進入細胞分裂狀態(active proliferative state)；而促進細胞分裂之訊息來自：生長因子(growth factor)、細胞外基質(extracellular component)、細胞與細胞之連結分子(cell-to-cell adhesion/interaction molecules)等；而許多癌細胞之致癌基因可藉由模擬(mimicking)正常生長訊息，因而減少其對生長刺激及正常組織微環境(normal tissue microenvironment)之依賴，如：癌細胞失去定著依賴性(anchorage-independent growth)，不須粘附於特定的細胞外基質上即能存活。

(2)對於抑制生長之訊息缺乏敏感度(insensitivity to antigrowth signals):在一般正常的組織裡，有許多抑制細胞分裂之訊息分子(antiproliferative signals)調控著細

胞的靜止(quiescence)以及組織的恆定性(homeostasis)；而抑制細胞分裂之訊息分子包括:水溶性的生長抑制因子(soluble growth inhibitors)以及鑲嵌於鄰近細胞表面或是細胞外基質(extracellular matrix)之固定化抑制因子(immobilized inhibitors)。例如正常細胞在體外(*in vitro*)培養時與其他細胞接觸時會停止生長，即接觸抑制現象(contact inhibition of growth)，反之由於癌細胞喪失接觸抑制(lost of contact inhibition)，因此細胞可堆疊生長，因此在體外培養時，癌細胞之細胞飽和度較正常細胞為高。

(3) 抵抗細胞凋亡(evading apoptosis)：在成人個體內，細胞的恆定(homeostasis)是由細胞生長及細胞死亡兩個過程來調控。癌細胞族群的細胞擴展(clonal expansion)除了決定於其細胞分裂之速率外，同時也取決於其細胞耗損(cell attrition)之速率。程式性細胞死亡又稱為細胞凋亡(apoptosis)，調控了主要的細胞耗損。引起細胞凋亡主要可經過兩個路徑：內發性的(intrinsic)以及外生性的(extrinsic)訊息傳導途徑。內發性的訊息傳導途徑(intrinsic pathway)泛指當細胞遭受任何環境壓力、刺激，例如DNA損傷、致癌基因活化、缺乏存活因子以及缺氧(Evan and Littlewood, 1998)等，造成粒腺體損傷，釋放出細胞凋亡的相關因子，如 cytochrome C 再活化下游之 caspases 引發細胞凋亡。外生性的訊息傳導途徑(extrinsic pathway)則是指當細胞表面的死亡受器(death receptors)與相對應之配體(ligand)結合後，所啟動之訊息傳遞路徑。通常此路徑仍會經由 caspase 8 活化，因此這兩種細胞凋亡的訊息傳導途徑是可以相互連結的(crosstalk)。

(4)無限制的細胞分裂能力(limitless replicative potential)：細胞內染色體終端的端粒(telomere)會隨著細胞分裂的次數而縮短，一般正常的體細胞缺乏端粒酶(telomerase)的活性，所以當端粒短到無法當作複製之模板時細胞即無法再分裂。在 *In vitro* 的細胞培養條件下，細胞分裂之次數到達約10~20代時，細胞之生長即會趨於緩慢並且停止生長，此現象稱為衰老(senescence)。有些細胞在 *In vitro* 的細胞培養條件下，則會經由細胞轉型而獲得無限制的分裂能力，此現象稱為不朽化

(immortalization)(Wright *et al.*, 1989)。

(5)持續的血管新生(sustained angiogenesis)：腫瘤由靜止轉為侵犯，必需破壞局部之促進血管新生因子(angiogenesis inducers)與抗血管新生因子(countervailing inhibitor)之間的平衡，以達成血管新生能力的轉換(angiogenic switch)(Hanahan and Folkman, 1996)。腫瘤細胞藉著改變細胞內基因的轉錄作用，例如血管內皮生長因子(VEGF) 以及EGF的過度表現 (overexpression) 促使血管新生能力的轉換 (angiogenic switch)。

(6)組織入侵及轉移(tissue invasion and metastasis): 癌細胞的轉移是極複雜的過程，主要包括四個步驟：上皮組織轉型的活化(activation of epithelial mesenchymal transition, EMT) (Spaderna *et al.*, 2007)，細胞外基質的重組 (Remodeling of extracellular matrix , ECM) (Sasisekharan *et al.*, 2002)，癌細胞轉移至其他定點 (Migration of cancer cells to specific secondary sites) (Hood and Cheresh, 2002)，血管新生 (Neo-angiogenesis) (Chambers *et al.*, 2002)。另外，細胞不正常表現的黏附分子 (adhesion molecules) 會具有潛在的侵犯性，目前已知與腫瘤轉移相關的黏附分子有cadherin、integrin、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)、CD44 (cluster of differentiation 44)、selectin等。

(五) 細胞轉型之特色(properties of transformed cell)(Flint, 2000)

- (1) 細胞型態改變(altered morphology): 細胞形狀趨於圓形
- (2) 喪失接觸抑制(lost of contact inhibition): 細胞可堆疊生長
- (3) 不須粘附於特定的細胞外基質(ability to grow without attachment to solid substrate): 失去定著依賴性
- (4) 無限制的增生能力(ability to proliferate indefinitely): 不朽化
- (5) 降低對生長因子的需求(reduced requirement for mitogenic growth factors)
- (6) 細胞飽和度增加(high saturation density)

- (7) 移除生長因子並不影響其增生(inability to half proliferation in response to deprivation of growth factors)
- (8) 增加對醣類的運輸(increased transport of glucose)
- (9) 腫瘤生成(tumorigenicity)

第三節 Rhotekin(RTKN)

Rhotekin (RTKN)是1996 年由Tim Reid 等人發現，為 Rho專一性的效應蛋白 (effector protein)之一(Reid *et al.*, 1996)，且由於本身不具有酵素或激酶(kinase)之活性而被定義為鷹架蛋白(scaffold protein)(Reid *et al.*, 1996)。RTKN由 550個胺基酸所組成，分子量約為 61 kDa，其N 端與Rho GTPase 結合的部分為Rho binding domain (RBD)被歸類為第一類型之Rho 效應蛋白模體(Rho effector motif , REM 1)，與同屬於REM1 之protein kinase N (PKN)及鷹架蛋白Rhophilin 之RBD 結構域(domain)之胺基酸序列約有30%相似度，而 RTKN的 Rho-binding domain亦被發現具有抑制 Rho本身水解 GTP的能力。RTKN 之C 端為一pleckstrin homology domain(PH)，可能與membrane targeting 有關，其後連接兩段Prolin rich 序列，可能與其他具有SH3 domain 之蛋白質有相互作用(Bishop and Hall, 2000)。目前對於 RTKN生理功能方面的研究發現RTKN 與Tax interacting protein-1(TIP-1) 之PDZ domain 有相互作用，且Rho 、RTKN及 TIP-1會一同促進 serum response element (SRE) 的活化(Reynaud *et al.*, 2000)。

(一) Rhotekin 過量表現使細胞具有抗凋亡的能力

胃癌的致病機轉是多重病變步驟的一個過程，然而基因調控或變異與胃癌病變之關聯並不清楚，基於這些原因，實驗室於數年前已展開尋找與胃癌致病相關的基因的工作，希望能藉著探討與胃癌相關的基因，了解胃癌致病的機轉，

且提供有效的診斷及預後的分子標誌。其中包括利用各種的差異表現分析(ordered differential display , ODD)，篩選在癌症組織中表現量異於正常組織的 cDNA 片段，其中一段cDNA 在胃癌組織之表現高於附近之非胃癌組織，此cDNA 在經定序，由database 比對結果得知與rhotekin (RTKN)具有高度相似性。在更進一步研究RTKN 之功能時，實驗室利用流式細胞移分析(flowcytometric analysis)發現於胃癌細胞株AGS (Gastric adenocarcinoma cell line)中過量表現RTKN，可使細胞具有抗細胞凋亡(anti apoptosis)及抗藥性(chemo- resistance)的能力(Liu *et al.*, 2004a)，但RTKN 過量表現所導致之抗細胞凋亡的現象，在加入NF-κB 抑制劑時會被阻斷。再更進一步經由報導基因表現分析(reporter assay)發現RTKN 過量表現可活化IKK β ，而活化之IKK β 會磷酸化I κ B 並促使I κ B 進一步降解，進而促使NF-κB 脫離I κ B 而轉入進核，促進下游cIAP-2, BCl-xL, A1 及A20 等與存活(survival)相關基因之表現(Liu *et al.*, 2004a)。

(二) Rhotekin 參與細胞骨架之調控

另一方面，實驗室的研究中也發現當過度表現RTKN 時，細胞會產生顯著的延展現象(extensive cell surface protrusion)，且伴隨細胞中應力纖維(stress fiber)及粘著斑(focal adhesion)之減少。利用個別表現RTKN N-及C-端之突變蛋白，發現RTKN 經由其N 端(包含Rho binding domain)影響細胞的型態，且活化態的Rho.V14 可抑制RTKN 所引發之細胞延展，因此推論RTKN 可能經由抑制Rho 之訊息傳遞進而影響細胞型態；更進一步證實RTKN 過度表現會降低MLC 磷酸化的程度，確認RTKN 過量表現可競爭活化態之Rho 而抑制ROCK 下游調控肌動蛋白纖維之訊息傳遞；且RTKN 過度表現不僅競爭並抑制細胞中活化態的Rho，同時造成細胞中Rac 之活性上升因而促使片狀偽足(lamellipodia)及膜波動(membrane ruffling)等突出之生成。

第二章 研究目標

綜合本實驗室先前之研究發現，RTKN在胃癌組織中有大量表現的情形，大量表現 RTKN的細胞具有較高的抗細胞凋亡能力(anti-apoptosis)(Reynaud *et al.*, 2000)，主要是RTKN能活化細胞中NF- κ B的訊息傳導路徑，而造成其下游抗凋亡基因的表達(Liu *et al.*, 2004b)；另外，我們實驗室也發現 RTKN的表現會引發細胞骨架的重整 (cytoskeleton rearrangement)，RTKN為Rho下游效應蛋白，當RTKN過量表現時，會與另一Rho下游效應蛋白ROCK競爭與Rho蛋白的結合，使ROCK調控的訊息傳遞受到影響，如細胞應力纖維和黏著斑生成減少；另一方面，Rho下游活性降低，會相對增加細胞中 Rac活性，而讓細胞型態呈現向外抽絲和分支的情形，而大量表現 RTKN的細胞也具有較高的移動能力。另外，在進行細胞培養時，我們發現轉染入RTKN的細胞，並不限於單層(monolayer)的生長，常有向上堆疊的現象，其生長不受空間之限制。這些現象說明了過量表現RTKN時，可能會促進細胞轉型(transformation)及遷移(migration)，因此可能參與胃癌生成以及轉移惡化之機制。

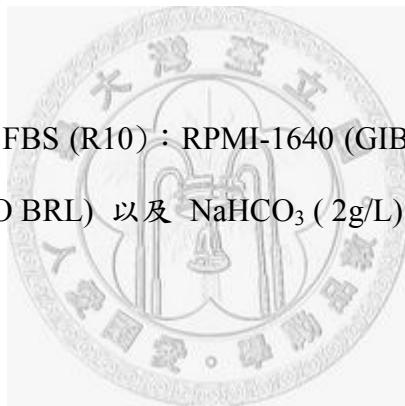
在本論文中，我們進一步探討 RTKN在細胞轉型(cell transformation)及遷移(migration)過程中所扮演的角色。我們分別在內生性RTKN表現量低的H1299及AZ-521細胞株內，表現大量的RTKN，並在內生性RTKN表現量高的 NUGC-3細胞株中，剔除RTKN的表現，對這些細胞進行飽和度測試、生長速率測試、細胞型態之改變、細胞遷移及入侵能力測試以及非固著性依賴生長(anchorage-independent growth)之能力測試。期望能藉由分析並釐定RTKN在細胞轉型時所扮演的角色，確定RTKN可能參與胃癌生成或惡化的過程。

第三章 材料與方法

第一節 細胞培養 (Cell culture)

(一) 細胞株

本論文所使用之細胞株包括人類非小細胞肺癌細胞株 (non-small cell lung cancer cell lines) NCI-H1299, 人類胃腺癌細胞株 AZ-521、NUGC-3 皆源自 American Type Culture Collection (ATCC)。



(二) 細胞培養液

RPMI medium + 10% FBS (R10) : RPMI-1640 (GIBCO BRL) 加上 10% FBS，含 0.025M HEPES (GIBCO BRL) 以及 NaHCO_3 (2g/L)，pH 值為 7.2~7.4。

(三) 細胞培養條件

H1299, AZ-521 及 NUGC-3 細胞株均培養於 RPMI medium + 10% FBS (R10) 培養液中。所有培養液皆含有 2 g/L 碳酸氫納 (sodium bicarbonate)、100,000 IU/L 青黴素 (penicillin)、100 mg/L 鍾黴素 (streptomycin) 及 0.25 mg/L amphotericin。細胞培養是在 37°C ，5% CO_2 的生長箱中進行。

(四) 細胞之繼代培養 (subculture)

以 T75 培養瓶 (T75 flask) 進行繼代培養為例 (作1:5~10稀釋)，在移去培養液後，以 1X PBS 緩衝液清洗細胞，加入 1mL 0.5% 之胰蛋白酶 (trypsin) 覆蓋細胞表面，立即吸走胰蛋白酶，並將細胞置於 5% CO_2 之 37°C 培養箱數分鐘，於顯微鏡下觀察細胞呈現圓形外觀後，加入含有 10% FBS 之新鮮培養液 10 mL，小心沖

洗，使細胞自培養皿脫落，並以培養液將細胞打散並混合均勻後，取適量細胞於含有 10 mL 新鮮培養液之培養皿中進行培養。第二天再次更換培養液。細胞每二天至四天做一次繼代培養。

第二節 西方墨點轉漬分析 (Western blot)

(一) SDS-PAGE

首先配製 7.5~15% 分離凝膠 (separating gel)，依序加入 4.25~8.45 mL 30% acrylamide溶液 (29.2% acrylamide, 0.8% bisacrylamide)、7.05 mL 1.5 M Tris (pH 8.8)、169 μ L 10% SDS、120~180 μ L 10% ammonium persulfate、10 μ L TEMED，加水 1.2~5.3 mL 並混合均勻後，倒入架好之 Hoefer Mighty Small dual gel caster 中，凝膠 (gel) 上端以75%酒精壓平，待分離凝膠 (separating gel) 凝固後，將75%酒精吸掉。接著配製 stacking gel，依序加入 1.15 mL 30% acrylamide溶液、1.5 mL 0.5 M Tris (pH 6.8)、75 μ L 10% SDS、150 μ L 10% ammonium persulfate、10 μ L TEMED，加水至 7.3 mL 並混合均勻後，倒入至分離凝膠 (separating gel) 上層，立即插入 comb，待凝結後，裝置於電泳槽內，注入 running buffer (2 mM Tris-Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) 後即可進行電泳。

(二) 西方墨點法 (Western blot)

取定量蛋白質加入適量 5 X SDS sample loading buffer 使最終濃度成為一倍的 SDS sample loading buffer，於 100°C 砂浴煮沸 5 分鐘，將蛋白質利用 SDS-PAGE於 90~120 V下進行電泳分離後，截去 stacking gel，將凝膠 (gel) 浸泡於 Transfer buffer (Tris- Glycin 2mM, 0.1% SDS, 20% Methnol, pH 8.3) 中，由負極向正極方向依序排列，3張 3MM 濾紙、凝膠、polyvinylidene fluoride (Pall Corporation - Life Sciences, Membrane, FluoroTrans®, PVDF) 轉漬膜、3張3MM

濾紙之組合，每一層預先用 Transfer buffer 濕潤 (PVDF membrane 需用 100% methanol 先潤洗 5 分鐘)，裝置於 SEMI-PHOR TransferSystem (HOEFER) 中，固定電流 75 mA 進行轉漬 80 分鐘。轉漬完成後將 PVDF 轉漬膜以阻斷劑 (blocking solution, T-TBS 溶液含有 5% 安佳脫脂奶粉或是含有 1% BSA) 於室溫下震盪浸泡 1 小時之後，加入一級抗體 (primary antibody，以 T-TBS 溶液做 1:500 至 1:5000 倍數稀釋)，於 4°C over night。本論文所使用之一級抗體 (primary antibody) 稀釋倍率各為： mouse anti-β actin (1:8000, Sigma #A5441)、mouse anti-Flag M2(1:8000, Sigma #F3165)、goat anti-RTKN(C-19) (1:1000, Santa Cruz #sc-6219)。之後轉漬膜以 T-TBS 溶液清洗 3 次，每次 10 分鐘，再加入接有過氧化物酶 (horseradish peroxidase；HRP) 之相對應二級抗體 (anti-mouse or anti-goat IgG-HRP, Santa Cruz # sc-2205 or #sc-2020)，二級抗體以 1:5000 倍數稀釋於 T-TBS 溶液中，於室溫下震盪浸泡至少 1 小時。再以 T-TBS 溶液清洗 3 次，每次 10 分鐘。最後進行 ECL (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce # 34080) 呈色反應，將 PVDF 轉漬膜加入等體積之 enhanced luminol 試劑及 oxidizing 試劑中反應 1 分鐘，稍微將 PVDF 轉漬膜上液體吸乾，再利用富士螢光冷光分析系統進行呈色，視訊號強弱決定呈色時間。

第三節 轉染反應 (Transfection)

(一) 轉染試劑 (Lipofectamine 2000)

以 24 孔細胞培養盤所培養之 H1299 細胞株為例，將 2 μL 的脂質體轉染試劑 (Lipofectamine 2000, Invitrogen, # 11668-019) 與 Opti-MEM 混合成總體積為 50 μL，靜置 5 分鐘後，與 50 μL 含有 1 μg 欲轉染質體的 Opti-MEM 合靜置 20 分鐘，之後將此 100 μL 混合液體加入培養在 0.5 mL 含有 Opti-MEM 細胞中，6 小時後，將培養液吸去，置換成為適當的培養液，再繼續培養 18~24 小時後，即可收

細胞進行免疫螢光染色(Immuno-fluorescence stain)或是西方墨點法(Western blot)。此外，H1299細胞株以 Lipofectamine 2000 : DNA =2 μ L : 0.3 μ g (per 24well) 之比例進行轉染，AZ-521細胞株以 Lipofectamine 2000 : DNA =2 μ L : 0.3 μ g (per well) 之比例進行轉染。

(二) 電穿孔 (Electroporation)

以1X PBS清洗細胞一次，再利用胰蛋白酶處理細胞，從多個 15公分培養皿收取細胞，以適量之培養液調整細胞密度為 2×10^7 cells/mL，取 1×10^7 細胞放入 14 mL聚丙烯圓底試管 (polypropylene round-bottom tube, Falcon, #35-2059) 中，加入 60 μ g的 DNA (包括 10 μ g plasmid，並以 sonicated salmon sperm DNA補足至 60 μ g)，輕輕搖晃管壁使 DNA與細胞充分混合均勻，室溫反應 5分鐘，接著迅速將細胞置入電穿孔的 cuvette中 (Bio-Rad, Gene Pulser cuvette, #941603)，然後以 Bio-Rad Gene Pulser在最適電壓，如: H1299細胞之最適轉染條件為 210 mV (在此條件下轉染的效率最高) 下進行電穿孔。最後將細胞培養於含 5 mM Na-butyrate 之預溫於 37°C 新鮮培養液中，12小時後，更換為不含 Na-butyrate 之培養液，再培養 8~12小時後，便可收下細胞進行之後的實驗。

第四節 製備穩定細胞株 (Stable clones)

以挑選H1299/RTKN穩定細胞株(stable clone)為例，先以上述之電穿孔方式將質體 Flag-RTKN與HA-Mock 以10:1之比例轉染入H1299細胞株中，12小時後更換為含500 μ g/ml G418抗生素之培養液，挑選RTKN穩定細胞株 (stable clone)。我們分別挑選了單一表現RTKN的穩定細胞株(single stable clone) 以及混合表現RTKN的穩定細胞株(pooled stable clone)。

(一) 單一表現RTKN的穩定細胞株 (single stable clone)

更換為含500 $\mu\text{g/ml}$ G418抗生素之培養液後，待細胞長滿單層，進行細胞之繼代培養(約1:10稀釋)，將細胞種植於15公分培養皿中使其長出單一群落，再以滅菌之牙籤沾取細胞，將沾取之細胞種植入24孔盤中，每一群落沾取之細胞種植入一個well中，不要混合，待其長滿後再放大至6孔盤中。大約每3天再繼代培養一次，如此經過三個循環後(約7~14天)，收取部份細胞利用西方墨點法確認細胞內轉染入之RTKN蛋白質含量。如西方墨點法確認結果無誤，接著再利用免疫螢光染色去觀察RTKN的表現量佔整個穩定細胞株多少之比例。

(二) 混合表現RTKN的穩定細胞株 (pooled stable clone)

更換為含500 $\mu\text{g/ml}$ G418抗生素之培養液後，待細胞長滿單層，進行細胞之繼代培養(約1:5稀釋)，大約每3天再繼代培養一次，如此經過三個循環後(約7~14天)，收取部份細胞利用西方墨點法確認細胞內轉染入之RTKN蛋白質含量。如西方墨點法確認結果無誤，接著再利用免疫螢光染色去觀察RTKN的表現量佔整個穩定細胞株多少之比例。為了確保中RTKN含量之穩定性，每隔一個月必須收取一次細胞進行西方墨點法，確認細胞內轉染入之RTKN存在與否以及蛋白質含量。

第五節 免疫螢光染色 (Immunofluorescence stain)

於 24孔盤中置入蓋玻片 (cover slide) 照紫外光 (UV light) 十分鐘，以1X PBS以及細胞培養液分別清洗過蓋玻片一次，每孔種 3×10^4 個細胞 (約三成)。12小時後可以 Lipofectamine 2000進行轉染，轉染 6小時後更換新鮮培養液，再12小時後以 4% paraformaldehyde (溶於1X PBS，pH 7.4) 於室溫下避光固定 (fixed) 30分鐘，以 1X TBS (50 mM Tris base，150 mM NaCl，pH 7.2 - 7.4) 清洗蓋玻片三次 (各10分鐘)以去除殘餘 para-formaldehyde。再以 5%BSA-TBBS

(TBS+ 5% BSA+0.1% Triton X-100) 37°C 60分鐘進行阻斷 (blocking)，去除背景值後，加入以 5%BSA-TBBS (TBS+ 3% BSA+0.1% Triton X-100) 稀釋之一級抗體：mouse anti-Flag M2 (1:200 , Sigma #F3165) 、rabbit anti-p-FAK(PY397) (1:200 , Biosource#44-624) 、rabbit anti-p-paxillin(PY118) (1:200 , Biosource#44-722G) 於 37°C標記目標蛋白 1小時，再以 1X TBS溶液清洗細胞三次 (每次 10分鐘)。再加入螢光標記之相對二級抗體：goat anti-mouse 488 、goat anti-rabbit 594 (1:200 , Molecular Probes # A-11013 or #A-11032)或 phalloidin-FITC (1:40 , Molecular Probes #F-432) 標記纖維狀肌動蛋白 (F-actin)，置於37°C標記目標蛋白 1小時，以 TBS清洗細胞兩次 (每次10分鐘) 和一次水洗 10分鐘後，將蓋玻片封於含有 DAPI (標記細胞核) 之封片油 (vectashield , vector , # H-1200) ，再以指甲油固定玻片，待指甲油乾後，即可於螢光顯微鏡下觀察。使用螢光40X螢光顯微鏡或是100X共軛焦顯微鏡(confocal microscope)觀察。



第六節 細胞飽和度測試

利用Lipofectamine 2000將質體HA-Mock或HA-RTKN轉染入H1299細胞株，以500 μ g/ml G418抗生素短暫篩選成功轉染之細胞3天；3天後，分別於12孔盤中種植 1×10^5 個細胞，將細胞置於37°C繼續培養，每隔2天更換培養液，並利用胰蛋白酶收取細胞(三重複)，再利用細胞計數器(Metertech EXCELL500)進行計數，計算每毫升培養液中的細胞數目。

第七節 細胞增生分析 (WST-1 assay)

利用Lipofectamine 2000將質體Flag-Mock或Flag-RTKN轉染入H1299細胞株，隔天，於96孔盤中每個well加入100 μ l 培養液並種植入 5×10^3 個細胞(五重複)，將

細胞置於37°C繼續培養。接著，每隔24小時收取一個時間點，每天收取細胞前，同時種植一盤H1299 細胞(已知細胞數目)作為線性標準，放回37°C繼續培養兩小時。每個well中加入10 μ l WST-1。因存活細胞內的粒線體中，具有能將WST-1(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)分解為 formazan 的呼吸鏈酵素。而 formazan可使特定波長下的吸光值增加；經過兩小時後，利用ELISA reader去讀取波長450 nm以及修正波長650 nm之吸光值。讀取數值後，利用EXCEL 畫出線性回歸線，並計算出細胞數目。

第八節 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

(一) 核糖核酸之抽取(RNA isolation)

將H1299及所有表現RTKN之H1299穩定細胞株種植於10公分培養皿，約2天後，細胞長滿，將培養皿取出，去掉培養液，以1X PBS沖洗一次，將培養皿置於冰上，加入1 ml Trizol，迅速以刮棒(cell scraper)將細胞刮下並收集於微量離心管(eppendorf)中，劇烈均勻混合(vortex)於室溫下靜置5分鐘。5分鐘後，加入0.2 ml chloroform，混合均勻並於室溫放置2~3分鐘，接著以12000 rpm於4°C離心15分鐘，取出上層液體，並加入0.5 ml isopropyl alcohol，混勻，於室溫下靜置10分鐘。再置於離心機，以12000 rpm於4°C離心15分鐘，倒掉液體留下沉澱物，以0.5 ml之75%酒精清洗沉澱物，接著以7500 rpm於4°C離心10分鐘，倒掉液體留下沉澱物，並使之乾燥，接著加入 20 μ l DEPC 水溶解沉澱物 RNA，即可得到。以OD₂₆₀吸光值測其濃度，並以OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 測其純度。

(二) 反轉錄酶反應 (Reverse Transcriptase, RT)

取 5 μ g 的 Total RNA 為模板，加入 500 ng random primers並加水至10 μ l，混合均勻，於70°C靜置10分鐘，之後立即放於冰上，並加入RT混合物 【4 μ l 5X

First-strand buffer, 2 μ l 100 mM DTT, 2 μ l 10 mM dNTP, 1 μ l 40 μ g/ μ l RNase inhibitor, 1 μ l (100U) Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18064)】混合均匀，於25°C靜置10分鐘，接著置於42°C反應1小時，再於70°C反應15分鐘做成cDNA。

(三) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

以製備好的 cDNA 為模板(template), 進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)。PCR所加入之反應物(總體積10 μ l)含有【1 μ l 10X PCR buffer, 1 μ l 2 mM dNTP, 0.1 μ l 10 μ M Forward primer, 0.1 μ l 10 μ M Reverse primer, 0.1 μ l (5U/ μ l) Taq DNA polymerase, 6.7 μ l 滅菌水】，進行 PCR 反應，反應依不同 primer 而使用不同條件。



(四) PCR反應之各條件

- GAPDH*：【 Primer Forward: 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC-3' ; Reverse: 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3' 】。條件: 95°C , 3分鐘 ; [95°C , 30 秒 ; 55°C , 30 秒 ; 72°C , 30 秒]重複22個循環 ; 72°C , 5分鐘。
- MMP-2*：【 Primer Forward: 5'-AAC CCT CAG AGC CAC CCC TA-3' ; Reverse: 5'-GTG CAT ACA AAG CAA ACT GC-3' 】。條件: 95°C , 3分鐘 ; [95°C , 30 秒 ; 62.4°C , 30 秒 ; 72°C , 45 秒]重複35個循環 ; 72°C , 7分鐘。
- MMP-9*：【 Primer Forward: 5'-TGG GCT ACG TGA CCT ATG AC -3' ; Reverse: 5'-CAA AGG TGA GAA GAG AGG GC -3' 】。95°C , 3分鐘 ; [95°C , 30 秒 ; 62.4°C , 30 秒 ; 72°C , 45 秒]重複40個循環 ; 72°C , 7分鐘。

第九節 基質金屬蛋白酶 (MMP) 酶譜法 (zymography)

首先備製明膠 (0.1% gelatin) - 9% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 5 μ l 濃縮過細胞上清液(concentrated condition medium)，加入 2X sample buffer (2.5 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8、2 ml Glycerol、4 ml 10% SDS 、0.5 ml 0.1% Bromophenol blue、Distilled Water to 10 ml)於室溫 10 分鐘，將 sample loading 到電泳片中，以 90V 進行 stacking gel 電泳分離，110V 進行 separation gel 電泳分離。大約 2 小時之後，將膠拆下，加入 denaturing buffer (2.5% Triton X-100 in water)，在室溫下搖 30 分鐘。倒掉 denaturing buffer 之後，加入 developing buffer (50 mM Tris base, pH 7.6、0.2 M NaCl、5 mM CaCl₂、0.02 % Brij 35)，於 37°C 恒溫箱下反應至少 4 小時。將反應完後的 gel，以 Coomassie Blue 染色 30 min，之後再以退染液退染觀看結果。



第十節 細胞遷移與入侵能力測試 (Migration and Invasion assay)

此細胞遷移與入侵測試使用48 孔洞的Boyden chambers (Neuro Probe, MD, U.S.A.) 以及聚碳酸酯濾膜 (polycarbonate filter, 8 μ m pore size)，模擬細胞在轉移時的環境。首先在非光滑面塗上纖維粘連蛋白 (fibronectin, 10 μ g/ μ l)，用鑷子夾起濾膜稍微晾乾，再放置培養皿上5分鐘。另外一面，光滑面塗上骨膠原 (Matrigel, BD, 1 mg/100 ml)，將骨膠原溶於無血清細胞培養液(DMEM, serum free)，塗上光滑面的濾膜上，均勻的塗抹並放於培養皿上晾乾半小時。之後用無血清之細胞培養液將細胞打散，並用含有0.1%血清的細胞培養液將細胞數固定在 3×10^5 cells/ ml，並給予老鼠IgG或Hermes-3。之後取出32 μ l的含血清細胞培養液加入Boyden chamber 下層的chamber中。然後將上下兩層合併在一起，中間隔著一層含有已塗上不同蛋白的聚碳酸酯濾膜。在上層的chamber裡加入50 μ l的細胞，每一種處理過的細胞均要充分的打散，並小心氣泡的產生。將其置於37°C的培養箱中，18小時後，拿出並用methanol固定聚碳酸酯濾膜 (此時細胞已經開始由上層migrate至下層)上的細

胞10分鐘，再用10 %的Giemsa使細胞染色，1小時；然後放在顯微鏡下觀察一定範圍的細胞轉移數目。若是要觀察轉移的細胞能力，只要單純的在非光滑面上塗上纖維粘連蛋白，4小時後，用同樣的方法固定染色，數算位於非光滑面上的細胞。

第十一節 洋菜軟膠方法 (soft agar assay) 分析非固著依賴性細胞生長(anchorage-independent growth assay, AIG)

先以1X PBS配置3.3% agarose (low melting各半)，高溫滅菌，滅菌後置於42°C水浴槽中。



(一) 配置下膠

取5 ml 3.3% agarose 加入 28 ml medium(最後濃度為%)，混合均勻，於每一個6公分培養皿中加入3 ml agarose medium混合液，靜置於laminar flow中，使下層膠凝結。將水浴槽溫度調整為39°C。

(二) 配置上膠

配製上層膠時，要先準備細胞懸浮液，細胞濃度為 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。再取13.5 ml 的細胞懸浮液與1.5 ml 3.3% agarose 混合均勻(最後濃度為%)，配成上層膠，於每一個6公分培養皿中加入3 ml agarose medium混合液，靜置於laminar flow中，使上層膠凝結。混合3.3% agarose medium 於細胞懸浮液時，應注意agarose 的溫度已自42°C降至39°C，可以用手於瓶外試溫，以agarose 尚未凝固，但又已降溫為原則，以免傷及細胞。

(三) 培養及染色

待上層膠凝固後，放入37°C培養箱內。隔天，於每一盤中加入2 ml 培養液，

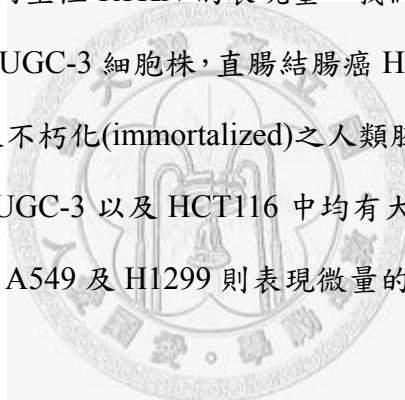
培養21天，每隔3天更換一次培養液。21天後，將細胞取出，靜置使其洋菜軟膠脫水乾燥，再以結晶紫染劑(iodonitrotetrazolium, 1mg/ml) 染色，照相。將影像以Metamorph分析計數，計數群落(colony)數目及大小。



第四章 結果

第一節 探討 RTKN 對細胞轉型之影響

根據本實驗室先前之研究，發現 RTKN 在胃癌組織中有大量表現之情形，為了進一步探討 RTKN 於胃癌之生成過程中所扮演的角色，我們將調整細胞中 RTKN 的表現量，並觀察細胞的活性變化。為了挑選適當的細胞株進行研究，我們首先測量各細胞株中內生性 RTKN 的表現量，我們利用西方墨點法以辨識 RTKN 之專一性抗體測試細胞所含的內生性 RTKN 的表現量，我們共測試了 8 株細胞株，分別為胃癌 AGS、AZ-521、NUGC-3 細胞株，直腸結腸癌 HCT116 細胞株、肺癌 A549、H1299、H460 細胞株以及不朽化(immortalized)之人類胚胎腎臟細胞株 HEK293。如圖一所示，在 AGS、NUGC-3 以及 HCT116 中均有大量的內生性 RTKN 表現，AZ-521 及 HEK293 次之，A549 及 H1299 則表現微量的 RTKN，H460 未表現內生性之 RTKN。



(一) 過度表現 RTKN 使細胞喪失接觸性抑制(lost of contact inhibition of movement)而造成細胞飽和度增加

在正常情況下，當細胞增殖到某種程度時，會由於空間的限制，使細胞間彼此的接觸面積加大，產生相互抑制的情形，而造成生長停止，此種現象稱為細胞間的接觸抑制(contact inhibition)。基於實驗上之操作簡易度，我們首先挑選了較易轉染的兩株細胞株：人類非小細胞肺癌細胞株 H1299 和人類胚胎腎臟細胞株 HEK293。使用 Lipofectamine 2000 將 Flag-RTKN 轉染入細胞株，接著利用免疫螢光染色的方法去觀察。如圖二所示，紅色螢光為 Flag(標記過度表現 Flag-RTKN 之

細胞)，綠色螢光為 Phalloidin-FITC (標記細胞中之纖維狀細胞蛋白)。在圖三 A 中，我們發現在 H1299 中過度表現 RTKN(帶有紅色螢光)之細胞型態出現明顯之突出(protusion)，延伸(extension)或分支(branching)之現象。我們也發現過度表現 RTKN 之細胞能直接攀附於其他未表現 RTKN 的單層細胞之上繼續生長(圖二，箭頭所指，紅綠螢光重疊處)。同時，在 HEK293 細胞株中我們也觀察到了同樣的現象(圖二 B 箭頭所指，紅綠螢光重疊處)。我們發現過度表現 RTKN 容易使細胞失去接觸抑制(lost of contact inhibition of movement)，即使細胞在飽和度低的情況下(未長滿單層)，尚能直接攀附於其他未表現 RTKN 的單層細胞之上繼續生長。此現象不同於 H1299 及 HEK293 兩株源細胞株(parental cell lines)，原來具有平鋪、不互相攀附、細胞長滿單層即停止生長等型態。

更進一步去分析這個現象，我們利用細胞飽和度測試，測量 RTKN 過量表現對細胞接觸抑制之影響。我們使用 Lipofectamine 2000 將 HA-Mock 或 HA-RTKN 轉染入 H1299 細胞株，以 G418 抗生素短暫篩選成功轉染之細胞 3 天；3 天後，分別於 12 孔盤中種植 1×10^5 個細胞，將細胞重新培養，每隔 2 天更換培養液並且收取其中一批細胞(三重複)利用細胞計數器進行計數。圖三為細胞計數後統計之結果，在細胞生長的前 1~7 天間，HA-Mock 及 HA-RTKN 之生長速率並無明顯差異，在細胞生長到達第 9 天時，細胞已長滿單層，此時細胞之生長開始趨於緩慢，在第 13 天時細胞停止繼續生長，實驗收到第 19 天時可以看到表現 HA-RTKN 之細胞數目為 HA-Mock 之 1.25 倍。由統計結果我們發現大量表現 RTKN 之細胞會增加細胞之飽和度(saturation density)。

(二) 過度表現 RTKN 對於細胞生長速率之影響

進一步探討 RTKN 對於生長速率之影響，我們利用 WST-1 assay 的方法來進行細胞增生之分析。首先利用 Lipofectamine 2000 將 Flag-Mock 或 Flag-RTKN 轉染入

H1299 細胞株，隔天分別於 96 孔盤中種植 1×10^3 個細胞，將細胞重新培養；接著，每隔 24 小時收取，利用 ELISA reader 讀取數據。

在 H1299(圖四 A)以及 AZ521(圖四 B)這兩株細胞株中，我們發現在細胞生長的前 3 天間(0~72 小時)，過度表現 RTKN 對於細胞之生長速率並無明顯影響，但是於細胞長滿後(72~120 小時)會增加細胞之飽和度。

(三) 過度表現 RTKN 使細胞型態改變

根據前述之免疫螢光染色結果(圖二)，我們發現過度表現RTKN之細胞型態有明顯之突出(protusion)，延伸(extension)或分支(branching)之現象。為進一步研究 RTKN 造成之細胞型態改變，我們首先探討RTKN 是否參與調控應力纖維(stress fiber)及粘著斑(focal adhesion)之生成；我們利用 Lipofectamine 2000 將 Flag-RTKN 質體轉染入H1299細胞株中，接著利用免疫螢光染色的方法，以 Phalloidin-FITC 標記細胞中之纖維狀肌動蛋白(圖五，Fibrous- actin，列二，綠色螢光部分)，同時利用辨識Flag的抗體與相對應之二級抗體，標記Flag-RTKN 表現之細胞(圖五，列一，有紅色螢光之細胞)；再以共軛焦顯微鏡(confocal microscope)觀察過量表現RTKN，對細胞內纖維狀肌動蛋白(Fibrous-actin)之含量及應力纖維(stress fiber)生成之影響。從細胞與蓋玻片底層的地方，垂直軸分層觀察，每層所切之厚度為 $0.5 \mu\text{m}$ 。由圖五可見不表現Flag-RTKN 之細胞，具有顯著之應力纖維(成束之F-actin； stress fiber)生成；而過度表現Flag-RTKN 之細胞，不僅應力纖維(stress fiber)變少，且由總體綠色螢光讀值可知，其總體的纖維狀肌動蛋白(Fibrous-actin)也顯著下降。

此外，由於應力纖維之生成與粘著斑之形成息息相關，focal complex 聚合 (clustering)形成粘著斑時，同時促使纖維狀肌動蛋白(Fibrous-actin)束化(bundle)形成應力纖維 {Kaibuchi, 1999 #38}。因此我們標記 p-paxillin 以及 p-FAK(組成粘

著斑之蛋白質)以觀察 Flag-RTKN(具紅色螢光者)過度表現對粘著斑(綠色螢光)之影響。由圖六可見不表現 Flag-RTKN 之 H1299 細胞(不具紅色螢光者)，細胞邊緣具有顯著之粘著斑(圖六 A，列二，綠色螢光部分，p-paxillin；圖六 B，列二，綠色螢光部分，p-FAK)較長較大之點狀聚集，標記 Flag-RTKN 表現之細胞(圖六 A、B，列一，有紅色螢光之細胞)，則無觀察到 focal complex 之生成。即過量表現 RTKN，會減少粘著斑之生成，甚至 focal complex 之生成。

(四) 過度表現 RTKN 對細胞骨架之影響

為了進一步觀察 RTKN 是否經由影響細胞骨架肌動蛋白之重整，而造成細胞型態之改變，我們利用電穿孔(electroporation)的方法將 Flag-Mock : HA-Mock 10 : 1 或 Flag-RTKN : HA-Mock 10 : 1 轉染入 H1299 細胞株中，挑選 RTKN 穩定細胞株(stable clone)。我們分別挑選了單一表現 RTKN 的穩定細胞株(single stable clone)：H1299/RTKN#7，#8，#33，#48，#53 和#90；以及混合表現 RTKN 的穩定細胞株(pooled stable clone)：H1299/RTKN pool#1 和 pool#2。首先，先利用西方墨點法測試此八株 RTKN 穩定細胞株中 RTKN 的表現量。根據圖七之結果顯示，此八株細胞株均可穩定表現 RTKN，其中 H1299/RTKN#7，#33 和#90 為 RTKN 高表現量之穩定細胞株；H1299/RTKN#8，#48 和#53 為 RTKN 低表現量之穩定細胞株。

接著，我們利用免疫螢光染色去觀察這八株RTKN穩定細胞株在細胞型態上的改變。由圖八(圖八A、B、C，行一，綠色螢光之細胞)發現不表現RTKN的H1299原細胞株呈現原始攤平之狀態，細胞邊緣平順無突出(protusion)或分支(branching)之現象。而當細胞表現 RTKN 時，細胞型態較不平整，外形有顯著突出(protusion)，延伸(extension)或分支(branching)之現象(圖八A、B、C，紅色螢光之細胞)。另外，我們也發現這些RTKN穩定細胞株尚具有其他形式之肌動蛋白結構，如絲狀偽足(filopodia)、片狀偽足(lamellipodia)、細胞膜波動(membrane

ruffling) 以及片狀偽足與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)接觸之位置所形成之focal complex。比較不表現RTKN之H1299源細胞株則不具有這些現象。我們也發現RTKN低表現量之穩定細胞株(圖八A，H1299/RTKN#8，#48和#53)，RTKN之分佈會大量聚集於片狀偽足(lamellipodia)生成之位置；RTKN高表現量之穩定細胞株(圖八B，H1299/RTKN#7，#33和#90)，RTKN之分佈則會大量聚集於絲狀偽足(filopodia)生成之位置，並且有較明顯之突出(protusion)或分支(branching)之現象。混合表現RTKN的穩定細胞株(圖八C，H1299/RTKN pool#1和pool#2)，也可觀察到絲狀偽足(filopodia)、片狀偽足(lamellipodia)、細胞膜波動(membrane ruffling)之肌動蛋白結構。

因此，我們認為RTKN 過量表現造成細胞骨架肌動蛋白纖維之重整，除了抑制肌動蛋白纖維束化形成應力纖維外，尚促使細胞產生絲狀偽足、細胞膜波動、片狀偽足等能力。接著，我們想進一步探討過度表現RTKN所引起之細胞型態改變以及細胞骨架重整，是否能給予細胞遷移(Migration)以及入侵(Invasion)之能力。

(五) 過度表現 RTKN 增加細胞遷移(Migration)及細胞入侵(Invasion)之能力

我們利用 Boyden chamber 的分析方法，來測定 RTKN 過度表現對於細胞遷移及細胞入侵之影響。此入侵測試使用 48 孔洞的 Boyden chambers (Neuro Probe, MD, U.S.A .) 以及聚碳酸酯濾膜(polycarbonate filter, 8 μm pore size)，模擬細胞在轉移時的環境。利用兩層 chamber 中隔一張有小孔的膜，首先在非光滑面塗上纖維粘連蛋白 (fibronectin, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，另外一面，光滑面塗上骨膠原 (Matrigel, BD, 1 mg/100 ml)，在下層 chamber 中加入含有血清之培養液當吸引物，上層加入細胞(細胞數固定在 3×10^5 cells/ ml，散佈在 0.1% 血清的細胞培養液)，當細胞被下層之吸引物(不同濃度之血清)吸引時，細胞會移動，由上層通過小孔穿過膜最後吸附在膜下層。將其置於 37°C 的培養箱中，18 小時後(若是要觀察轉移的細胞能力，只要單純

的在非光滑面上塗上纖維粘連蛋白，4 小時後，用同樣的方法固定染色，數算位於非光滑面上的細胞)，拿出並用 methanol 固定聚碳酸酯濾膜上的細胞 10 分鐘，再用 10 % 的 Giemsa 使細胞染色，1 小時；然後放在顯微鏡下觀察一定範圍的細胞轉移數目。

圖九 A 為 H1299 源細胞株以及 RTKN 穩定細胞株(H1299/RTKN#48，#90，pool#1 以及 pool#2)染色後之照相結果，圖九 B 為染色後計數之統計結果(每次實驗為八重複，此統計結果為三次之獨立實驗)。由我們的結果得知，對於細胞遷移之能力測試(下層 1.0% 血清，作用 4 小時)，RTKN 穩定細胞株(H1299/RTKN#48，#90，pool#1 以及 pool#2)細胞遷移細胞數目比起 H1299 源細胞株上升三倍之多。其中，在單一表現 RTKN 的穩定細胞株中，H1299/RTKN#48 以及#90，細胞遷移之數目與其 RTKN 之表現量成正比。在細胞入侵之能力測試(下層 0.2% 血清，作用 18 小時)，RTKN 穩定細胞株(H1299/RTKN#48，#90，pool#1 以及 pool#2)(圖十)穿透過孔徑移動至下層之細胞數目比起對照組 H1299 源細胞株上升兩倍之多。同樣地，在單一表現 RTKN 的穩定細胞株中，H1299/RTKN#48 以及#90，細胞入侵之數目與其 RTKN 之表現量成正比。

根據以上之結果，我們認為過度表現 RTKN 具有增加 H1299 細胞遷移及細胞入侵之能力。

(六) 分析 RTKN 穩定細胞株中 MMP 之含量及活性

細胞遷移及細胞入侵之能力與細胞所分泌之基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)有著密切關係，其中又以 MMP-2 和 MMP-9 為已知影響細胞移動能力之 MMPs (1999)。我們分別抽取了 H1299 源細胞株以及 RTKN 穩定細胞株(H1299/RTKN#48，#90，pool#1 以及 pool#2)的 mRNA 進行 RT-PCR。利用 RT-PCR 的方式去分析過度表現 RTKN 增加細胞遷移及細胞入侵之能力，是否與

MMPs 之表現量有關。結果顯示(圖十一，行 2~6)，RTKN 穩定細胞株(H1299/RTKN#48，#90，pool#1 以及 pool#2)之 MMP-2 含量高於 H1299 源細胞株(parental cell line)；MMP-9 之表現量則無明顯差異。

進一步，我們利用 Zymography (Gelatin)的方法去探討 MMP-2 和 MMP-9 在這些穩定表現 RTKN 之細胞株中之活性為何。MMP-2 和 MMP-9 會對 gelatin 進行分解，可以在 SDS-PAGE 上形成清楚的 band，所以我們可以根據 band 的強弱來作為活性之判定。結果發現(圖十二)，H1299 源細胞株以及 RTKN 穩定細胞株(H1299/RTKN#48，#90，pool#1 以及 pool#2)均可分泌 pro-MMP-2 以及 pro-MMP-9 來分解 SDS-PAGE 中的 gelatin，使的膠片染色、褪色後有明顯的 band 出現。比較圖十二中行 1~5 之強弱，我們發現在 H1299 源細胞株以及 RTKN 穩定細胞株(H1299/RTKN#48，#90，pool#1 以及 pool#2)中 MMP-2 和 MMP-9 的分泌量均無明顯差異。



(七) 細胞過度表現 RTKN 促進其非固著性依賴生長(anchorage-independent growth)之能力

腫瘤細胞的特性為不受控制的增生，在 In vitro 的培養條件下，腫瘤細胞除了有前述之不受接觸抑制(contact inhibition)之特性，尚具有不需附著(anchorage-independent growth ; AIG)之生長能力。

利用 H1299 以及 RTKN 穩定細胞株(H1299/RTKN#48，#90，pool#1 以及 pool#2)，進行洋菜軟膠培養基測試(Soft agar assay)，分析其非依賴固著性生長能力(anchorage-independent growth)。圖十三 A 為 H1299 源細胞株以及 RTKN 穩定細胞株(H1299/RTKN#48，#90，pool#1 以及 pool#2)染色後之照相結果，圖十三 B 為染色後計數之統計結果(每次實驗為五重複，此統計結果為三次之獨立實驗)。我們發現穩定表現 RTKN 之細胞株在洋菜軟膠培養基培養三個星期後，長出的聚落

(colony)數目及聚落大小均比 H1299 源細胞株多。其中，在單一表現 RTKN 的穩定細胞株中，H1299/RTKN#48 以及#90，長出聚落之數目與其 RTKN 之表現量成正比。

第二節 探討胃癌細胞中 RTKN 的含量對細胞轉型之影響

為了進一步探討 RTKN 於胃癌之生成過程中所扮演的角色，我們根據圖一之結果，挑選了兩株胃癌細胞株: AZ-521(RTKN 表現量低)以及 NUGC-3(RTKN 表現量高)，進一步大量表現或剔除 RTKN 的表現。在 AZ-521 中轉染入 HA-Mock 以及 HA-RTKN 並挑選穩定細胞株(AZ-521/Mock 以及 AZ-521/RTKN)；在 NUGC-3 中則利用對 RTKN 具專一性的 sh-RNA 剔除內生性 RTKN 之生成，並挑選穩定細胞株(NUGC-3/control、NUGC-3/sh-RTKN#1 以及 NUGC-3/sh-RTKN#2)。接著，利用西方墨點法確認穩定細胞株中 RTKN 之含量(圖十四)，AZ-521/RTKN 細胞中 RTKN 之表現量明顯高於 AZ-521/Mock 細胞中 RTKN 之表現；在 NUGC-3/sh-RTKN#1 細胞以及 NUGC-3/sh-RTKN#2 細胞中 RTKN 之表現量和 NUGC-3/control 相比較，雖無法完全地抑制掉內生性之 RTKN，但是仍然減少了一半 RTKN 細胞中的表現量。

我們分別在低內生性 RTKN 表現的 AZ-521 細胞株表現大量的 RTKN，並在高表現量 RTKN 的細胞株 NUGC-3 中剔除 RTKN 的表現後，進行細胞遷移及侵侵能力測試、MMP 含量及活性測試以及非固著性依賴生長(anchorage-independent growth)之能力測試。

(一) 於 AZ-521 胃癌細胞株中過度表現 RTKN

在 AZ-521 穩定細胞株中，對於細胞遷移之能力測試(下層 3.0% 血清，作用 4 小時)，AZ-521/RTKN 穿透過孔徑移動至下層之細胞數目比起 AZ-521/Mock 上升

約兩倍(圖十五，行 1、2)。同樣地，在細胞入侵之能力測試(下層 3.0%血清，作用 18 小時)，AZ-521/RTKN 穿透過孔徑移動至下層之細胞數目比起 AZ-521/Mock 上升約兩倍(圖十六，行 1、2)。利用統計分析，發現均有顯著差異。

進一步，我們利用 RT-PCR 去分析在 AZ-521 穩定細胞株中(圖十七，行 1,2)MMP-2 以及 MMP-9 mRNA 之表現量，發現不論是 MMP-2 或 MMP-9 之表現量，AZ521/RTKN 均高於 AZ521/Mock。接著，利用 Zymography (Gelatin)的方法去探討 MMP-2 和 MMP-9 在 AZ-521 穩定細胞株中之活性為何。比較在 AZ-521 過度表現 RTKN 之穩定細胞株(AZ-521/Mock 和 AZ-521/RTKN，圖十八，行 1,2)，MMP-2 和 MMP-9 的分泌量均無明顯差異。

(二) 於 NUGC-3 胃癌細胞株中剔除 RTKN 之表現

在 NUGC-3 穩定細胞株中(NUGC-3/control、NUGC-3/sh-RTKN#1 以及 NUGC-3/sh-RTKN#2)，對於細胞遷移之能力測試(下層 3.0%血清，作用 4 小時)我們發現抑制內生性之 RTKN 會減少細胞遷移之能力，細胞移動之數目降低約二分之一(圖十五，行 3~5)。同樣地，在細胞入侵之能力測試(下層 0.2%血清，作用 18 小時)，抑制內生性之 RTKN 會減少細胞入侵之能力，細胞移動之數目降低約二分之一(圖十六，行 3~5)。

進一步，我們利用 RT-PCR 去分析在 NUGC-3 穩定細胞株中(圖十七，行 3~5)MMP-2 以及 MMP-9 mRNA 之表現量，在 NUGC-3/control、NUGC-3/sh-RTKN#1 以及 NUGC-3/sh-RTKN#2 中 MMP-2 或 MMP-9 之表現量均無明顯差異。接著，利用 Zymography (Gelatin)的方法去探討 MMP-2 和 MMP-9 在 AZ-521 穩定細胞株中之活性為何。比較 NUGC-3 穩定細胞株(NUGC-3/control、NUGC-3/sh-RTKN#1 和 NUGC-3/sh-RTKN#2，圖十八，行 3~5)中，MMP-2 和 MMP-9 的分泌量均無明顯差異。

另外，在 NUGC-3 穩定細胞株中(NUGC-3/control、NUGC-3/sh-RTKN#1 以及

NUGC-3/sh-RTKN#2)，進行洋菜軟膠培養基測試，分析其非依賴固著性生長能力，我們發現抑制內生性之 RTKN 會明顯地減少細胞長出的聚落數目(圖十九)。



第五章 討論

在本論文中，主要是探討 RTKN 在胃癌的生成過程中所主導的細胞轉型作用 (cell transformation)。RTKN 為 Rho 的效應蛋白 (effector protein)，可與活化態的 Rho 有相互作用，並承接來自 Rho 的訊息。本實驗室之前研究發現 RTKN 過量表現於胃癌組織中，且過量表現 RTKN 可使細胞具有抗凋亡的能力及抗藥性，因此我們認為 RTKN 於胃癌生成中扮演重要的角色。

我們在此研究中，針對 RTKN 是否能促進細胞轉型進行分析，分別利用 RTKN 低表現量的非小細胞肺癌 H1299 細胞株以及從胃癌 AZ-521 細胞株、高 RTKN 表現量的胃癌 NUGC-3 細胞株來進行實驗。我們發現細胞過度表現 RTKN 會促使細胞飽和度增加、細胞骨架之重整造成細胞型態改變，並且促進細胞非固著性依賴生長 (anchorage-independent growth) 之能力。此外 RTKN 過度表現也會促進細胞潛行及侵犯的能力。



第一節 探討 RTKN 促使細胞飽和度增加

進行細胞繼代培養時，在同樣的培養時間下我們發現轉染入RTKN的細胞株，其生長之密度較未轉染之源細胞株 (parental cell line) 高。接著，我們利用免疫螢光染色的方法去觀察，發現過度表現RTKN之細胞能直接攀附於其他未表現RTKN的單層細胞之上繼續生長 (圖二，箭頭所指，紅綠螢光重疊處)，因此過度表現RTKN能使細胞喪失接觸抑制 (contact inhibition of growth) 的現象。相對的，過度表現RTKN會增加細胞飽和度 (圖三)；因此我們結論過度表現RTKN之細胞於細胞培養皿上具有堆疊生長的能力，造成細胞形成 foci，此為細胞轉形之重要特性之一。

接著，我們利用 WST-1 assay，測試 RTKN 表現對細胞生長的影響。我們將經轉染 RTKN 的 H1299 細胞培養於含有 0.1%、0.5%、1%、5% 以及 10% 的胎牛血清培養

液中，並未發現 RTKN 的表現會造成細胞生長速率的改變；但是我們發現過度表現 RTKN 之細胞會增加細胞之飽和度 (saturation density)。此外，我們也將轉染 RTKN 的胃癌 AZ-521 細胞培養於含有 0.1%、0.5%、1% 以及 10% 的胎牛血清培養液中，也同樣發現 RTKN 的表現並不會改變細胞生長之速率，但是會增加細胞之飽和度 (saturation density)。我們認為 RTKN 可能不影響細胞生長，而是影響細胞之存活或著其他方面，另外也可能是因為 H1299 以及 AZ-521 兩株細胞株對於血清之需求量較低，甚至是在 0.1% 的胎牛血清存在下，即可維持其細胞之生長，所以才會看不出生長速率之差異，也許可以嘗試以無血清 (serum-free) 的細胞培養液進行實驗，再比較細胞的生長速率。

第二節 探討 RTKN 引發細胞骨架重整而造成細胞型態改變

由於 Rho 的主要功能之一為調控細胞骨架及形態，且本實驗室先前之研究發現與 RTKN 有相互作用之蛋白質與調控或組成細胞骨架有關 (vinexin β ，組成粘著斑之蛋白之一)，因此我們接著探討 RTKN 是否參與 Rho 所調控之細胞骨架重整。結果發現過量表現 RTKN 之細胞外形具有顯著突出 (protrusion)、延伸 (extension) 及分支 (branching) 等異於源細胞之型態 (圖二)。

我們發現 RTKN 過度表現會抑制 Rho 所調控之應力纖維 (stress fiber) (圖五) 及粘著斑 (focal adhesion) 生成 (圖六)，但是根據實驗室之前研究發現 RTKN 過量表現並不影響組成粘著斑蛋白質之表現量 (附圖一)，因此我們推測 RTKN 過量表現可能是抑制了粘著斑蛋白質群體之組合，因而造成細胞型態改變以及應力纖維 (stress fiber) 及粘著斑 (focal adhesion) 生成受到抑制 (圖五、圖六)。

另外，我們在表達 RTKN 的 H1299 穩定細胞株中發現，應力纖維 (stress fiber) 及粘著斑 (focal adhesion) 生成皆有減少，同時也產生其他肌動蛋白纖維結構 (actin) 之變化，如：絲狀偽足 (filopodia)、細胞膜波動 (membrane ruffling)、片狀偽足

(lamellipodia)等突出(protrusion)生成(圖八)。同時，片狀偽足與細胞外基質(extracellular matrix)接觸的位置有 focal complex 之形成，由於文獻指出此類結構於細胞中由 Rac 所調控，因此我們推測 RTKN 過度表現促使細胞中 Rac 的活性上升，我們也發現 RTKN 的過量表現可經由 Rac 活化促使細胞向外產生突出(protrusion)的能力上升(圖二、圖五)。在癌細胞剛開始移動時，需要有一連串細胞訊息刺激細胞內細胞骨架 (cytoskeleton)的變化，細胞前端 (leading edge)會向有化學刺激或是沿著細胞間基質有細胞膜突出 (membrane protrusion)。在細胞前端也會生成新的黏著斑 (focal adhesion)讓細胞與基質更加緊密的連接，而在細胞末端(trailing edge)的黏著斑 (focal adhesion)會快速的減少，讓細胞朝著刺激前進。而由於細胞向外產生突出為細胞移動的第一步(Carlier *et al.*, 2003; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Webb *et al.*, 2002)，因此我們進一步探討 RTKN 過量表現是否影響細胞遷移能力。



第三節 探討 RTKN 增加細胞遷移 (Migration)及細胞入侵 (Invasion)之能力

許多文獻指出細胞中的 Rho 和 Rac 之間有直接或間接互相抑制的作用，當細胞中 Rho 活性較高時，由於穩定的應力纖維(stress fiber)生成，細胞處於不利於遷移的狀態，此時細胞中 Rac 及 Rac 引發(Rac-induced)之活性較低(Yamaguchi *et al.*, 2001)，反之若細胞中 Rac 活性較高時，細胞向外產生突出(protrusion)的能力會上升，且通常此時細胞中 Rho 活性較低，細胞之遷移能力較(Nimnuan *et al.*, 2003; Schmitz *et al.*, 2000)。另外文獻指出當 Rho/ROCK 的訊息被抑制時，會促使細胞中之粘著斑(focal adhesion)降解，同時 focal complex 之生成崩解(turn over)較快，且此時之細胞中 Rac 活性上升並促使片狀偽足(lamellipodia)及膜波動(membrane ruffling)之生成，使細胞之移動能力上升(Rottner *et al.*, 1999)，因此我們推論 RTKN 過量表現抑制細胞中 Rho/ROCK 之訊息，因而促使細胞中 Rac 活性上升，細胞向

外產生突出及遷移能力上升。

我們利用 Boyden chamber 的分析方法，測定 RTKN 過度表現對於細胞遷移 (Migration) 及細胞入侵 (Invasion) 之影響。在 H1299 細胞株中，我們發現過度表現 RTKN 會增加細胞遷移及細胞入侵之能力，並且發現細胞遷移及細胞入侵之能力與細胞內 RTKN 表現量成正比。在 AZ-521 細胞株中，我們將 Boyden chamber 的下層血清濃度調整成不同的濃度 (3.0% 以及 5.0% 血清)，測試 AZ-521 穩定細胞株在不同血清濃度下細胞遷移及細胞入侵之能力。當我們在 Boyden chamber 的下層給予 3.0% 之血清時，即可觀察到 AZ-521 細胞株具有遷移及入侵之能力，其中 3.0% 或 5.0% 之血清對於 AZ-521 穩定細胞株細胞遷移及細胞入侵之能力並無太大差異，於是我們選擇了 3.0% 之血清條件進行實驗。結果顯示 AZ-521/RTKN 細胞遷移及細胞入侵之能力高於 AZ-521/Mock，並且發現 AZ-521/RTKN 細胞穿過濾膜至下層後與 AZ-521/Mock 相比較細胞擴展面積增加 (圖十五、圖十六)。在 NUGC-3 細胞株中，進行細胞遷移實驗時顯示在 1.0% 血清條件下，NUGC-3 細胞株並未有明顯之細胞遷移現象，於是我們將 Boyden chamber 的下層血清調整成 3.0% 以及 5.0% 血清，經過測試選擇 3.0% 血清濃度作為 NUGC-3 細胞株之條件，在此條件下發現剔除掉 NUGC-3 細胞株之內生性 RTKN 含量會降低其細胞遷移之能力。

細胞遷移 (Migration) 及細胞入侵 (Invasion) 之能力與細胞所分泌之基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 有著密切關係，其中又以 MMP-2 和 MMP-9 為已知影響細胞移動能力之 MMPs (1999)。所以，我們同時也利用了 RT-PCR 以及 Zymography (Gelatin) 的方法來分析 MMP-2 和 MMP-9 在這些穩定表現 RTKN 之細胞株中的含量及活性。RT-PCR 之結果顯示，RTKN 穩定細胞株 (H1299/RTKN#48, #90, pool#1 以及 pool#2) 之 MMP-2 含量高於 H1299 源細胞株 (parental cell line)；MMP-9 之表現量則無明顯差異，我們可以發現 H1299 源細胞株中 MMP-2 以及 MMP-9 之表現量已經非常地高，比較細胞遷移以及細胞入侵之實驗，可以得知 H1299 細胞株在低量的血清濃度時即可觀察到細胞遷移以及入侵之現象，也許是

和其 MMP 之表現量相關。另外，在 AZ-521 穩定細胞株中(圖十七，行 1,2)，我們則發現不論是 MMP-2 或 MMP-9 之表現量，AZ-521/RTKN 均高於 AZ-521/Mock。NUGC-3 穩定細胞株中(圖十七，行 3~5)，在 NUGC-3/control、NUGC-3/sh-RTKN#1 以及 NUGC-3/sh-RTKN#2 中 MMP-2 或 MMP-9 之表現量均無明顯差異。

將此一結果相對照於 Zymography (Gelatin) (圖十二、圖十八)，我們測試了不同的濃縮條件，分別收取細胞培養液進行 5 倍、4 倍以及 2 倍濃縮，發現細胞培養液中 MMP-2 和 MMP-9 分泌量過多，導致背景值太高而無法比較。最後我們選擇直接收取細胞培養液不經過濃縮之步驟，希望能夠壓低背景值，結果顯示這些穩定表現 RTKN 之細胞株中的 MMP-2 和 MMP-9 分泌量均無明顯差異。因此，對於細胞過度表現 RTKN 可促進細胞遷移(Migration)以及入侵(Invation)之影響及細微調控，尚值得更一步探討。



第四節 探討 RTKN 促進細胞非固著性依賴生長 (Anchorage independent growth) 之能力

將轉型之細胞培養於洋菜軟膠中，細胞能夠生長成球形的聚落(spherical colonies)，每一個聚落包含了幾十個到幾百個以上的細胞，此種具有不需附著於固態基質之生長能力(anchorage-independent growth；AIG)是細胞轉型的重要指標之一。在體外實驗(In vitro)，非固著性依賴生長(anchorage-independent growth)之能力可以作為預測細胞於體內環境(In vivo)中是否能生成腫瘤。

我們挑選了 H1299 以及 RTKN 穩定細胞株(H1299/RTKN#48，#90，pool#1 以及 pool#2)，進行洋菜軟膠培養基測試(Soft agar assay)，分析其非依賴固著性生長能力(anchorage-independent growth)。發現穩定表現 RTKN 之 H1299 細胞株在洋菜軟膠培養基培養三個星期後，長出的聚落(colony)數目及聚落大小均比 H1299 源細胞株(parental cell line)多。其中，在單一表現 RTKN 的穩定細胞株(single stable clone)

中，H1299/RTKN#48 以及#90，長出聚落(colony)之數目與其 RTKN 之表現量成正比。另外，在 NUGC-3 穩定細胞株(NUGC/control、NUGC/sh-RTKN#1 以及 NUGC/sh-RTKN#2)，我們則發現抑制內生性之 RTKN 會減少細胞長出的聚落數目(圖十三)。但是，對於個別細胞株中所生長出的聚落(colony)大小之差異，我們尚未了解其詳細之機制，仍有待進一步之研究探討。

另外，在 In vivo 的腫瘤生成實驗中，我們利用 SCID 小鼠測試了 AZ-521 胃癌細胞株於老鼠皮下生長之情形 (in vivo tumorigenesis)；我們發現 AZ-521/RTKN 之穩定細胞株有 67% (4/6) 小鼠生成腫瘤，而 AZ-521/Mock 之穩定細胞株無腫瘤生成 (0/6)。此結果進一步地證實 RTKN 可促進腫瘤之發生。

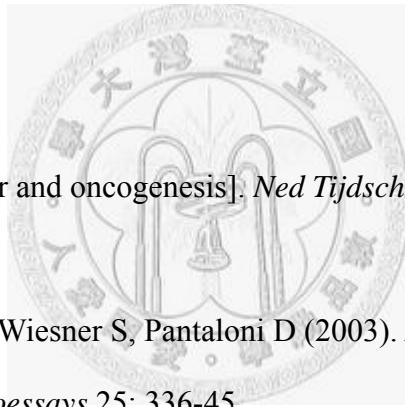
總結先前之實驗，我們針對細胞轉型的特性對過度表現 RTKN 之細胞進行分析。發現了過度表現 RTKN 使得細胞喪失接觸性抑制(contact inhibition of growth)而造成細胞飽和度增加，促使細胞骨架重整造成細胞型態改變，增加細胞遷移(Migration)及細胞入侵(Invasion)之能力，發現細胞過度表現 RTKN 促進其非固著性依賴生長(anchorage-independent growth)之能力。我們藉由本研究之分析 RTKN 所給予細胞轉型之特性，推論 RTKN 可能於胃癌生成或惡化中扮演著一重要之角色。

參考文獻

(1999). Erratum: *Cancer Chemother Pharmacol* (1998) 42: 433-440. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 43: 439.

Becker WM (2009). *The world of the cell*. Pearson/Benjamin Cummings: San Francisco.

Bishop AL, Hall A (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2: 241-55.



Bloemena E (2008). [Cancer and oncogenesis]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 115: 180-5.

Carlier MF, Le Clainche C, Wiesner S, Pantaloni D (2003). Actin-based motility: from molecules to movement. *Bioessays* 25: 336-45.

Catalano V, Labianca R, Beretta GD, Gatta G, de Braud F, Van Cutsem E (2005). Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 54: 209-41.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2: 563-72.

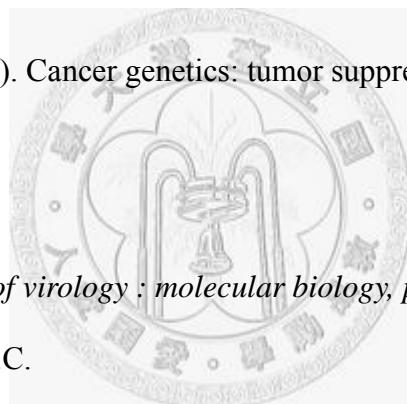
Chipponi J, Huguier M, Pezet D, Basso N, Hay JM, Quandalle P *et al* (2004). Randomized trial of adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer. *Am J Surg* 187: 440-5.

Coleman MP, International Agency for Research on C, International Union against C, International Association of Cancer R (1993). *Trends in cancer incidence and mortality*. International Agency for Research on Cancer: Lyon.

Domann FE, Futscher BW (2004). Flipping the epigenetic switch. *Am J Pathol* 164: 1883-6.

Evan G, Littlewood T (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281: 1317-22.

Fearon ER, Dang CV (1999). Cancer genetics: tumor suppressor meets oncogene. *Curr Biol* 9: R62-5.



Flint SJ (2000). *Principles of virology : molecular biology, pathogenesis, and control*. ASM Press: Washington, D.C.

Funato T (1999). [Oncogenes and tumor suppressor genes as a tool for clinical diagnosis of solid tumors]. *Rinsho Byori* 47: 1020-6.

Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 793-805.

Gonzalez CA, Sala N, Capella G (2002). Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 100: 249-60.

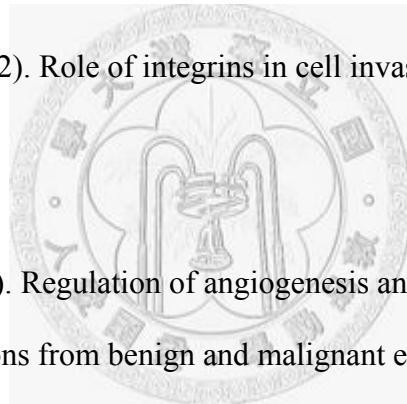
Greene FL, Singletary SE, Balch CM, American Joint Committee on C. (2002). The Committee: Chicago, Ill.

Hanahan D, Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-64.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Heber D, ScienceDirect. Elsevier-Academic Press: Amsterdam; Boston.

Hood JD, Cheresh DA (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2: 91-100.



Klafter R, Arbiser JL (2000). Regulation of angiogenesis and tumorigenesis by signal transduction cascades: lessons from benign and malignant endothelial tumors. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5: 79-82.

Klein G (1988). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Acta Oncol* 27: 427-37.

Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359-69.

Lee K, Liu Y, Mo JQ, Zhang J, Dong Z, Lu S (2008). Vav3 oncogene activates estrogen receptor and its overexpression may be involved in human breast cancer. *BMC Cancer* 8: 158.

Lewis J (2007). *Molecular biology of the cell*. Garland Science ; Taylor & Francis [distributor]: New York; London.

Liu CA, Wang MJ, Chi CW, Wu CW, Chen JY (2004a). Overexpression of rho effector rhotekin confers increased survival in gastric adenocarcinoma. *J Biomed Sci* 11: 661-70.

Liu CA, Wang MJ, Chi CW, Wu CW, Chen JY (2004b). Rho/Rhotekin-mediated NF-kappaB activation confers resistance to apoptosis. *Oncogene* 23: 8731-42.

Lundquist EA (2006). Small GTPases. *WormBook*: 1-18.



Macdonald JS (2006). Gastric cancer--new therapeutic options. *N Engl J Med* 355: 76-7.

Master SS (2004). Gastric carcinoma. *Dis Mon* 50: 532-9.

Ming SC (1977). Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer* 39: 2475-85.

Neugut AI, Hayek M, Howe G (1996). Epidemiology of gastric cancer. *Semin Oncol* 23: 281-91.

Ng K, Meyerhardt JA, Fuchs CS (2007). Adjuvant and neoadjuvant approaches in gastric cancer. *Cancer J* 13: 168-74.

Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D (2003). Redox-dependent downregulation of Rho

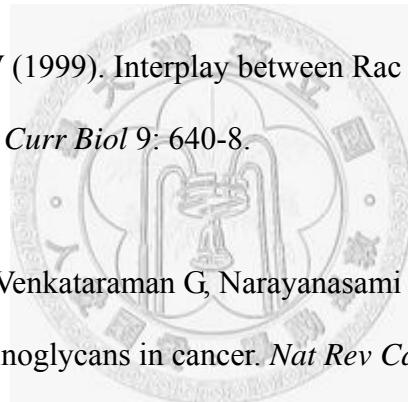
by Rac. *Nat Cell Biol* 5: 236-41.

Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K *et al* (1996).

Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* 271: 13556-60.

Reynaud C, Fabre S, Jalinot P (2000). The PDZ protein TIP-1 interacts with the Rho effector rhotekin and is involved in Rho signaling to the serum response element. *J Biol Chem* 275: 33962-8.

Rottner K, Hall A, Small JV (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol* 9: 640-8.



Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U (2002). Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 521-8.

Sato M, Kato J, Takeya T (1989). Characterization of partially activated p60c-src in chicken embryo fibroblasts. *J Virol* 63: 683-8.

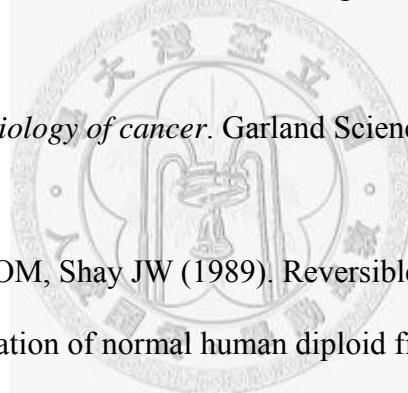
Schmitz AA, Govek EE, Bottner B, Van Aelst L (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* 261: 1-12.

Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Jung A, Kirchner T, Brabletz T (2007). Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions during cancer progression. *Verh Dtsch Ges Pathol* 91: 21-8.

Talley NJ, Fock KM, Moayyedi P (2008). Gastric Cancer Consensus conference recommends Helicobacter pylori screening and treatment in asymptomatic persons from high-risk populations to prevent gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 103: 510-4.

Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G, Jr., Winchester D, Osteen R (1993). Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg* 218: 583-92.

Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol* 4: E97-100.

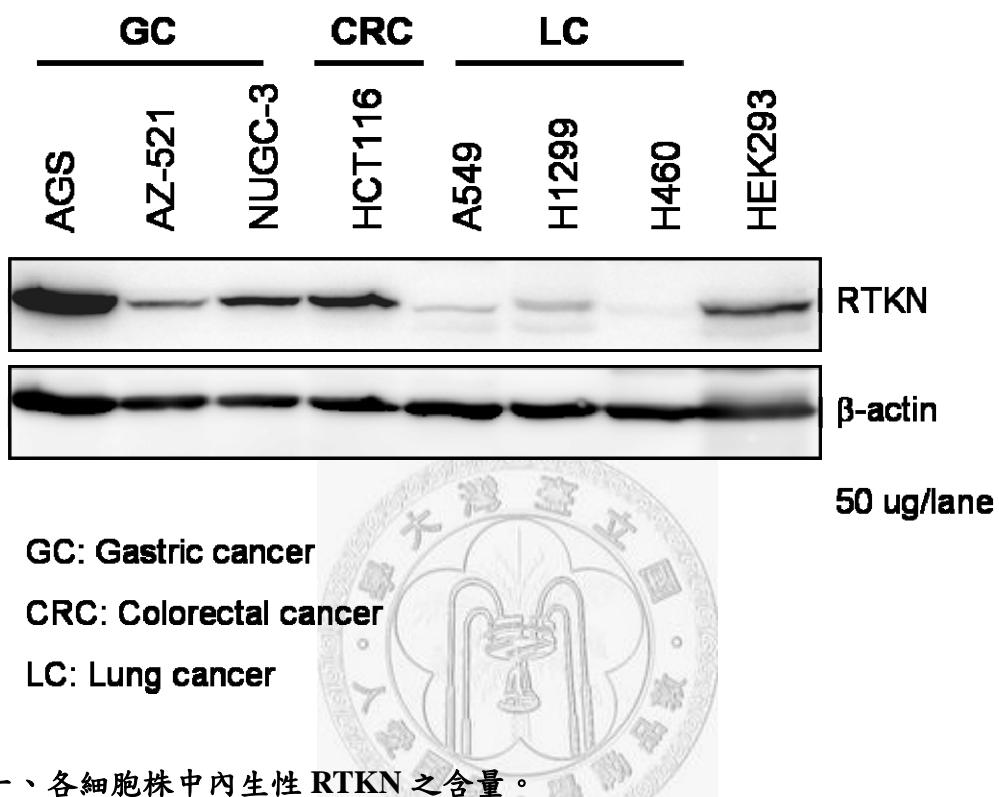


Weinberg RA (2007). *The biology of cancer*. Garland Science: New York.

Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 9: 3088-92.

Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Mori K, Negishi M (2001). RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 276: 18977-83.

行政院衛生署. 台北.

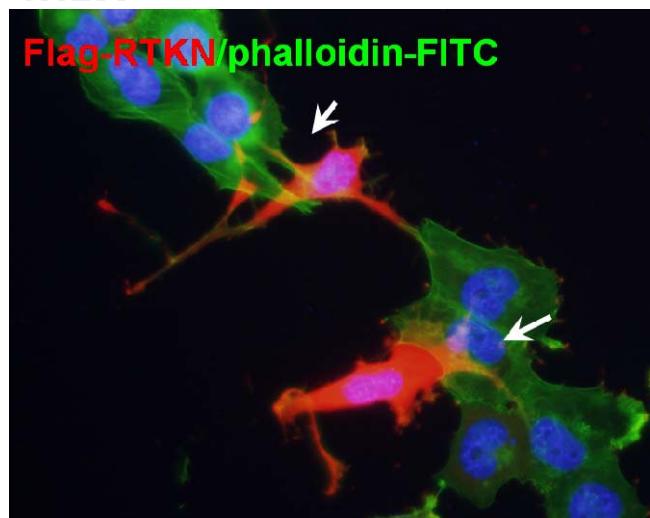


圖一、各細胞株中內生性 RTKN 之含量。

以細胞溶解緩衝液溶解胃癌細胞株 AGS、AZ-521 和 NUGC-2、直腸結腸癌細胞株 HCT116、肺癌細胞株 A549、H1299 和 H460 以及不朽化(immortalized)之人類胚胎腎臟細胞株 HEK293 共八株細胞株，並收取蛋白質。利用西方墨點法辨識 RTKN 之專一性抗體測試細胞所含的內生性 RTKN 之含量。並以β-actin 做為蛋白質定量之對照組。

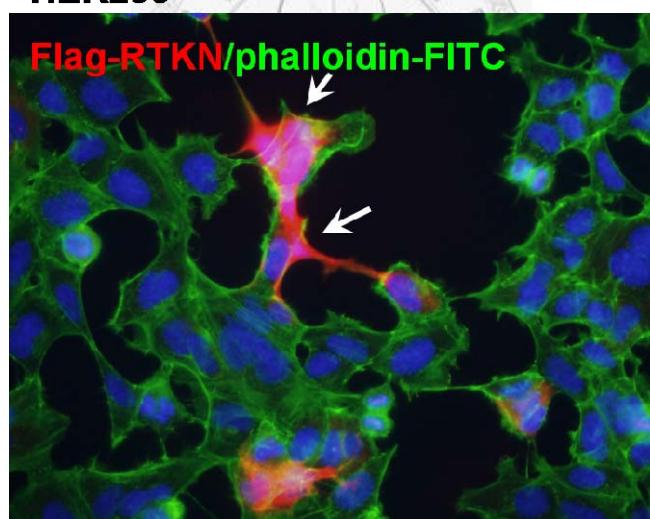
A.

H1299



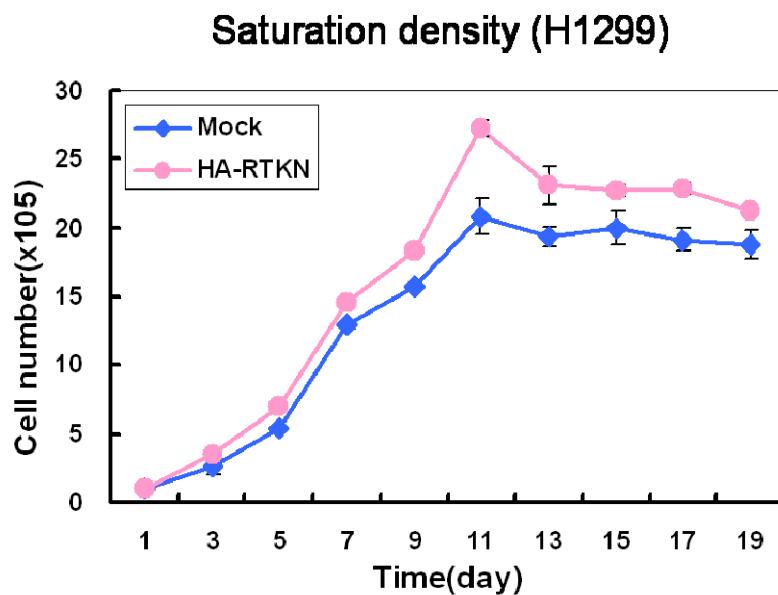
B.

HEK293



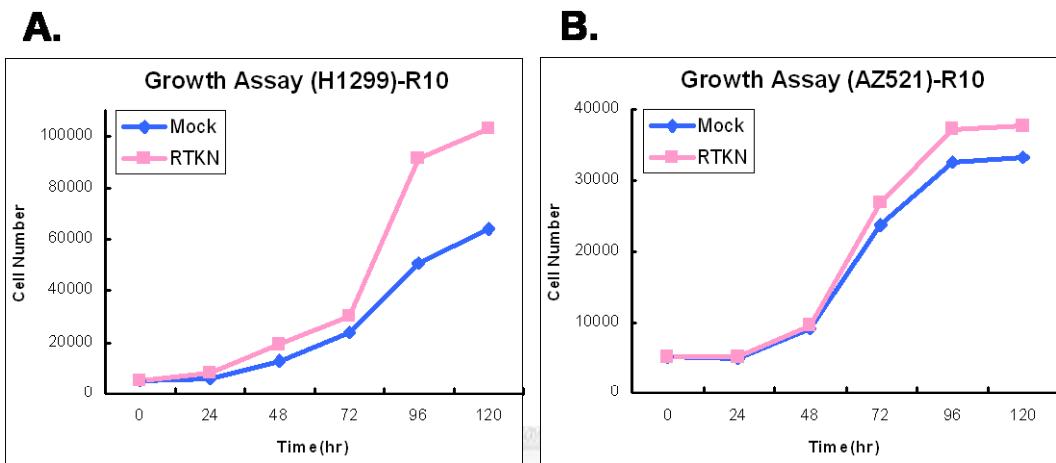
圖二、過度表現 RTKN 造成細胞喪失接觸性抑制(lost of contact inhibition of movement)。

將(A)H1299 人類非小細胞肺癌細胞株；(B) HEK293 人類胚胎腎臟細胞株種在 24 孔盤中，每孔種 3×10^4 個細胞，隔天使用 Lipofectamine 2000 將 Flag-RTKN 轉染入細胞中，24 小時後利用免疫螢光染色的方法去觀察 RTKN(以 Flag 標記，並以紅色螢光染 Flag)及 actin(以綠色螢光之 Phalloidin-FITC 染色)的表現，發現過度表現 RTKN 之細胞可攀附於其他未表現 RTKN 的單層細胞上繼續生長(箭頭所指，紅綠螢光重疊處)。並以藍色 DAPI 標定細胞核。



圖三、過度表現 RTKN 使細胞飽和度增加。

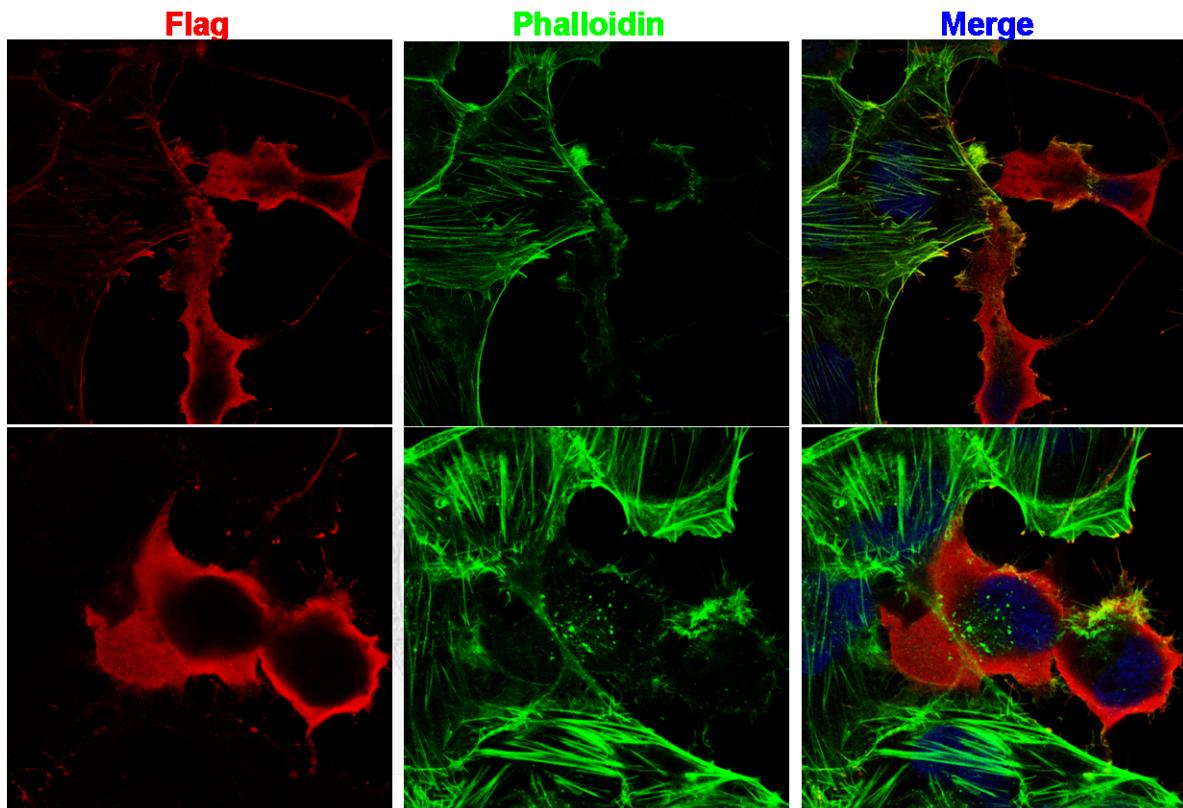
我們使用 Lipofectamine 2000 將 HA-Mock 或 HA-RTKN 轉染入 H1299 細胞株，以 G418 抗生素篩選轉染之細胞；3 天後，分別於 12 孔盤中種植 1×10^5 個細胞，將細胞重新培養，每隔 2 天更換培養液，並按時收取細胞(三重複)利用細胞計數器計算數目。



圖四、RTKN 對於細胞生長速率之影響。

以 WST-1 assay 的方法來進行細胞增生之分析。首先利用 Lipofectamine 2000 將 Flag-Mock 或 Flag-RTKN 轉染入(A)H1299 人類非小細胞肺癌細胞株；(B)AZ521 人類胃腺癌細胞株，隔天分別於 96 孔盤中種植 1×10^3 個細胞，將細胞重新培養；每隔 24 小時收取進行 WST-1 assay，利用 ELISA reader 讀取數據，測量細胞數目。

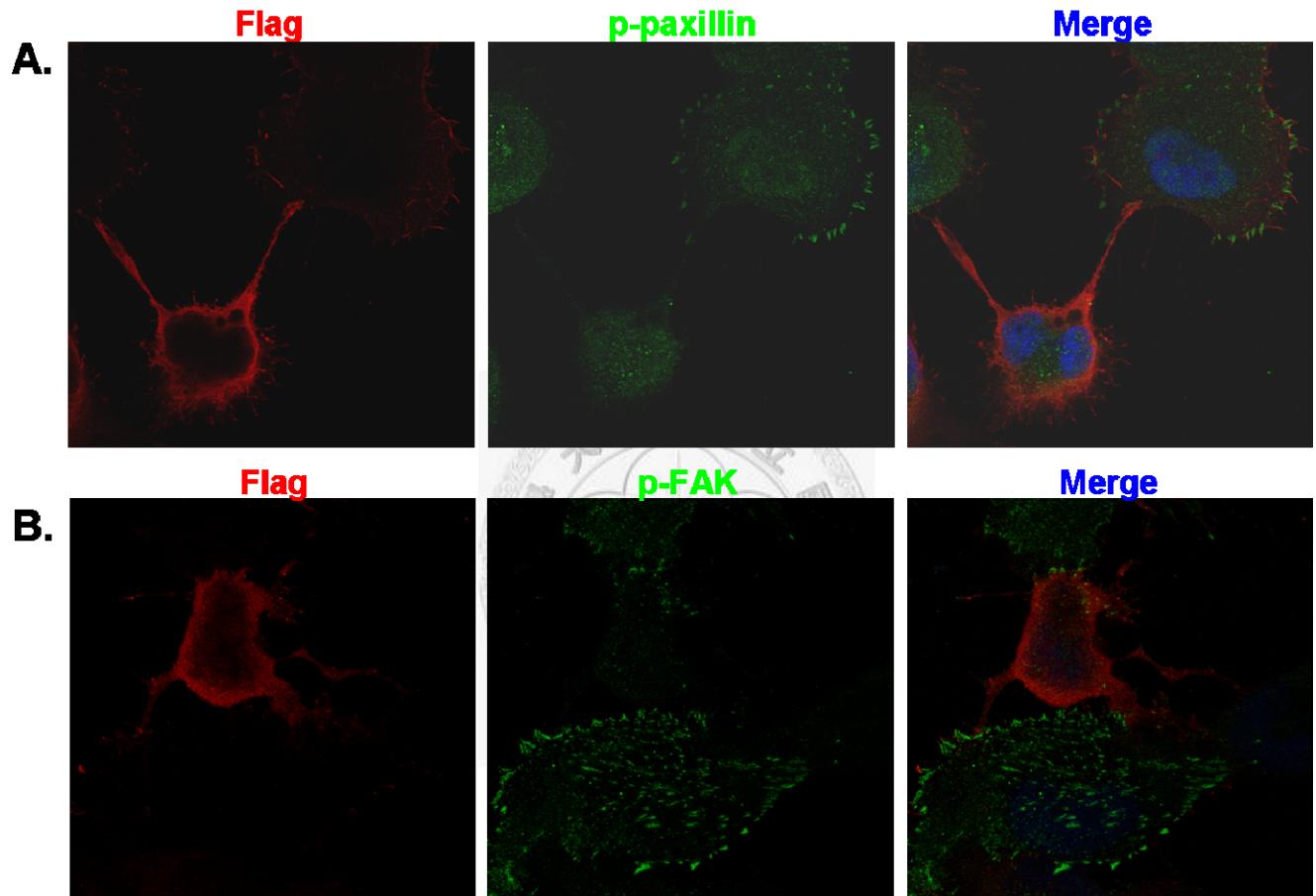
H1299 tTF with Flag-RTKN



圖五、RTKN過度表現造成纖維狀肌動蛋白(F-actin)含量減少及降低應力纖維(stress fiber)的生成。

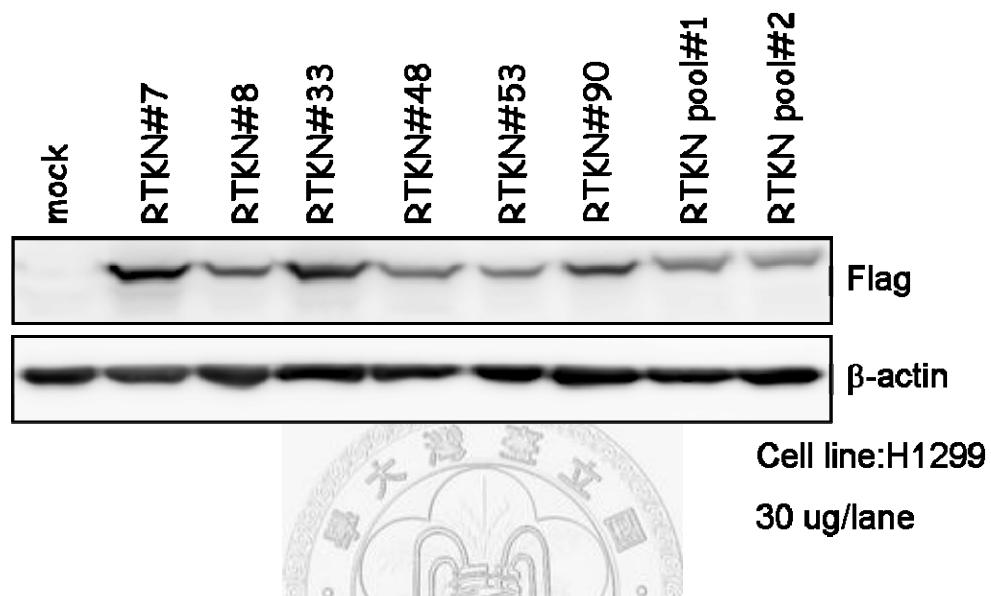
將細胞種在24孔盤中，每孔種 3×10^4 個細胞，隔天使用Lipofectamine 2000 將Flag-RTKN轉染入H1299細胞株，24小時後利用免疫螢光染色的方法去觀察RTKN(以Flag標記，並以紅色螢光染Flag)及actin(以綠色螢光之Phalloidin-FITC染色)的表現。再以共軛顯微鏡(confocal microscope)觀察過量表現RTKN，對細胞內纖維狀肌動蛋白(Fibrous-actin)之含量及應力纖維(stress fiber)生成之影響。從細胞與蓋玻片底層的地方，垂直軸分層觀察，每層所切之厚度為 $0.5 \mu\text{M}$ 。(上下分別為兩次獨立實驗)

H1299 tTF with Flag-RTKN

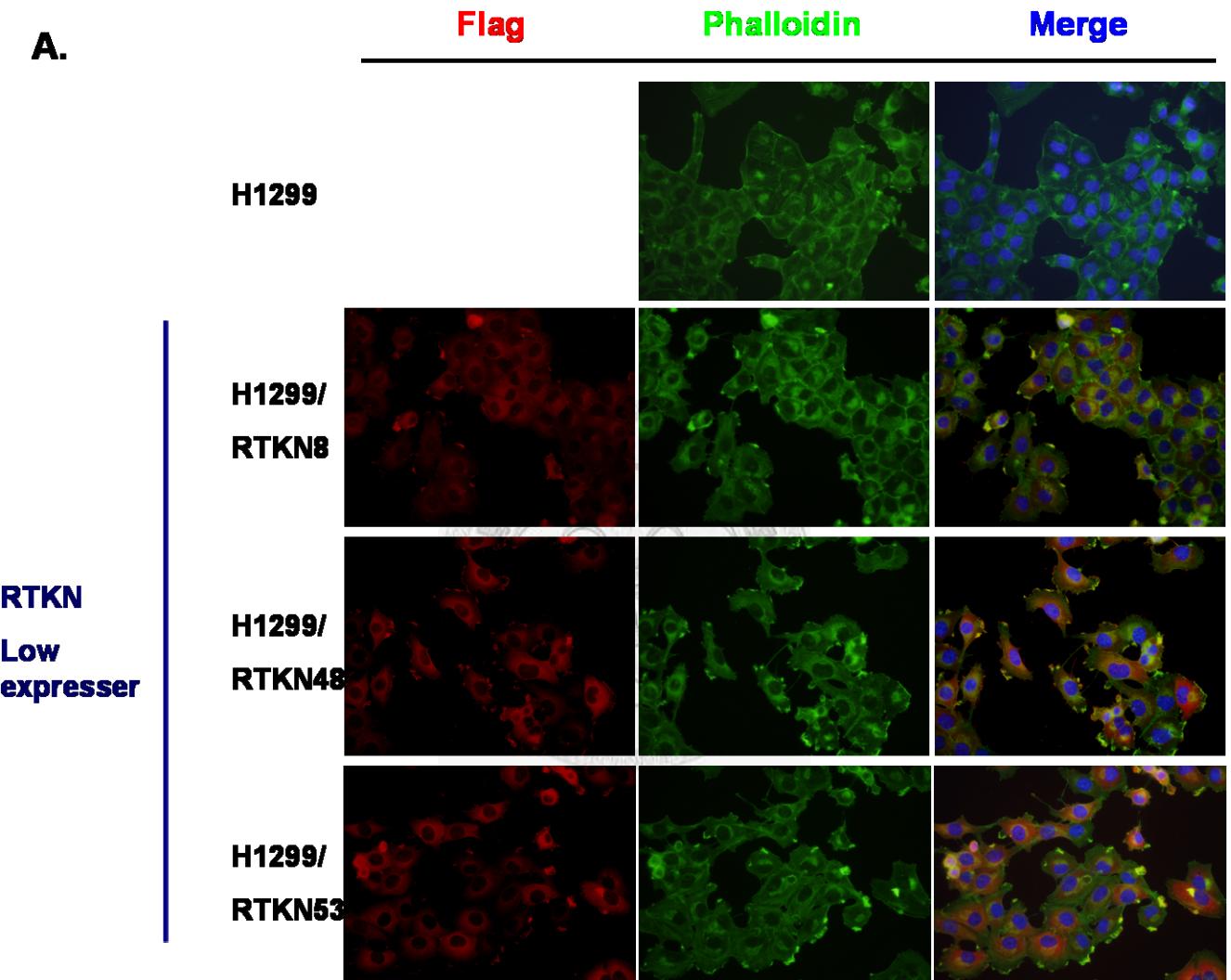


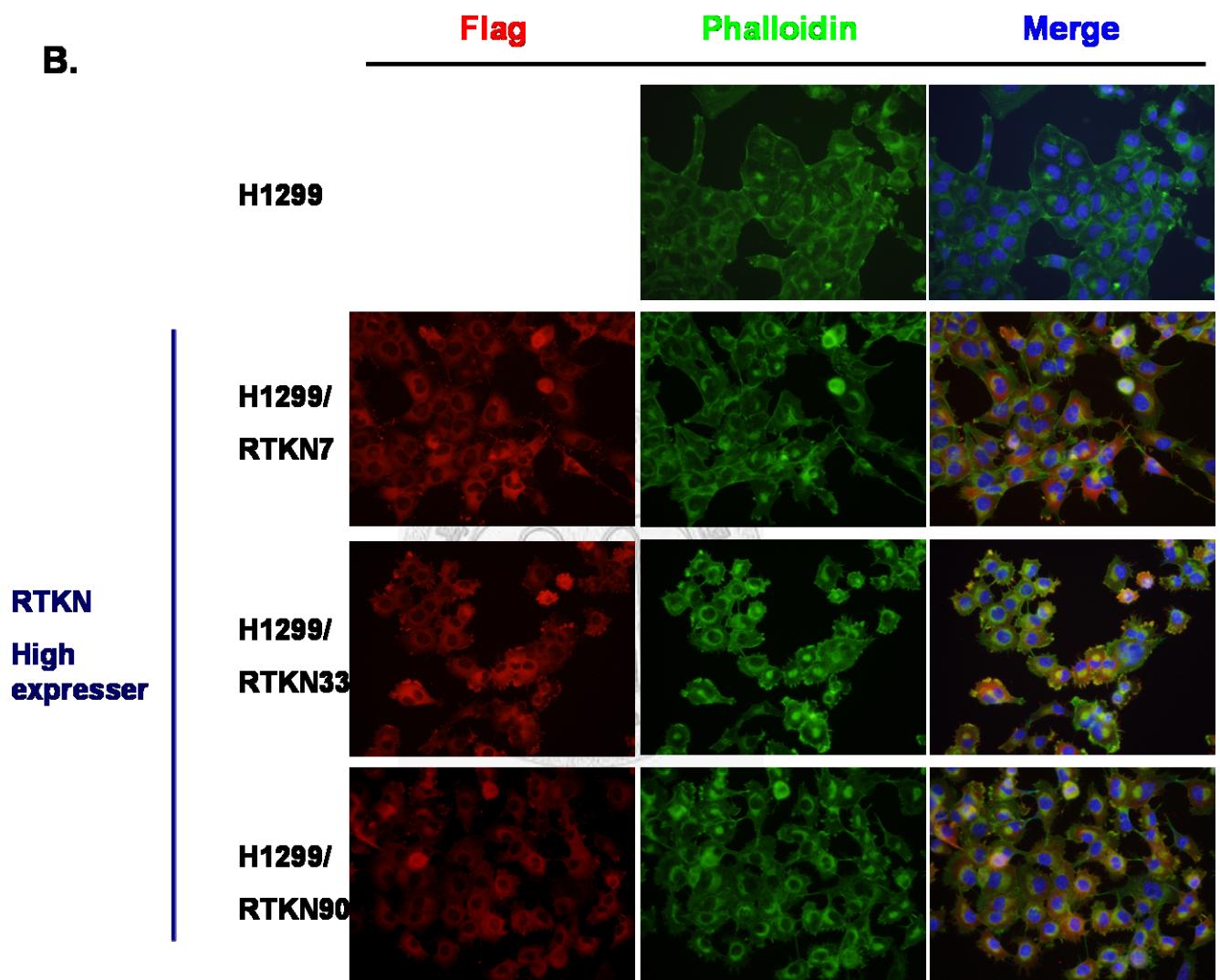
圖六、RTKN過度表現抑制粘著斑(focal adhesion)之形成。

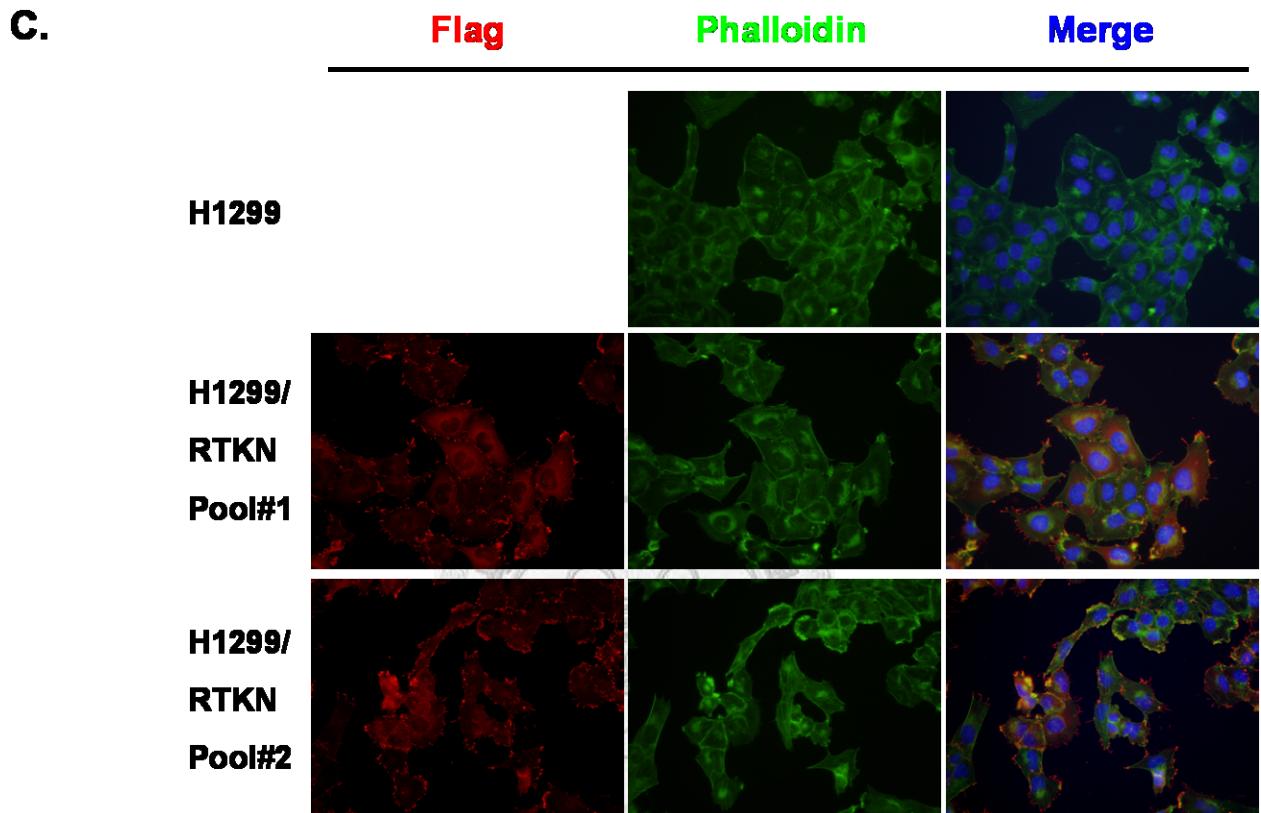
將 H1299 細胞種在 24 孔盤中，每孔種 3×10^4 個細胞，隔天使用 Lipofectamine 2000 將 Flag-RTKN 轉染入細胞，24 小時後利用免疫螢光染色的方法去觀察 RTKN(以 Flag 標記，並以紅色螢光染 Flag)，綠色螢光為細胞中組成黏著斑之蛋白質(A)p-paxillin；(B)p-FAK，再以共軛焦顯微鏡(confocal microscope)觀察過量表現 RTKN，對細胞內粘著斑(focal adhesion)生成之影響。從細胞與蓋玻片底層的地方，垂直軸分層觀察，每層所切之厚度為 $0.5 \mu\text{m}$ 。



圖七 、穩定表現 RTKN 之 H1299 細胞株，並測量各細胞株中 RTKN 之表現量。
 我們利用電穿孔(electroporation)的方法將 Flag-Mock : HA-Mock 10 : 1 或 Flag-RTKN : HA-Mock 10 : 1 轉染入 H1299 細胞株中，挑選 RTKN 穩定細胞株 (stable clone)。挑選了單一表現 RTKN 的穩定細胞株(single stable clone) : H1299/RTKN#7, #8, #33, #48, #53 和#90；以及混合表現 RTKN 的穩定細胞株(pooled stable clone) : H1299/RTKN pool#1 和 pool#2。利用西方墨點法以特異性辨識 RTKN 之專一性抗體之偵測穩定細胞株中內生性 RTKN 之含量。並以 β -actin 做為蛋白質定量之對照組。

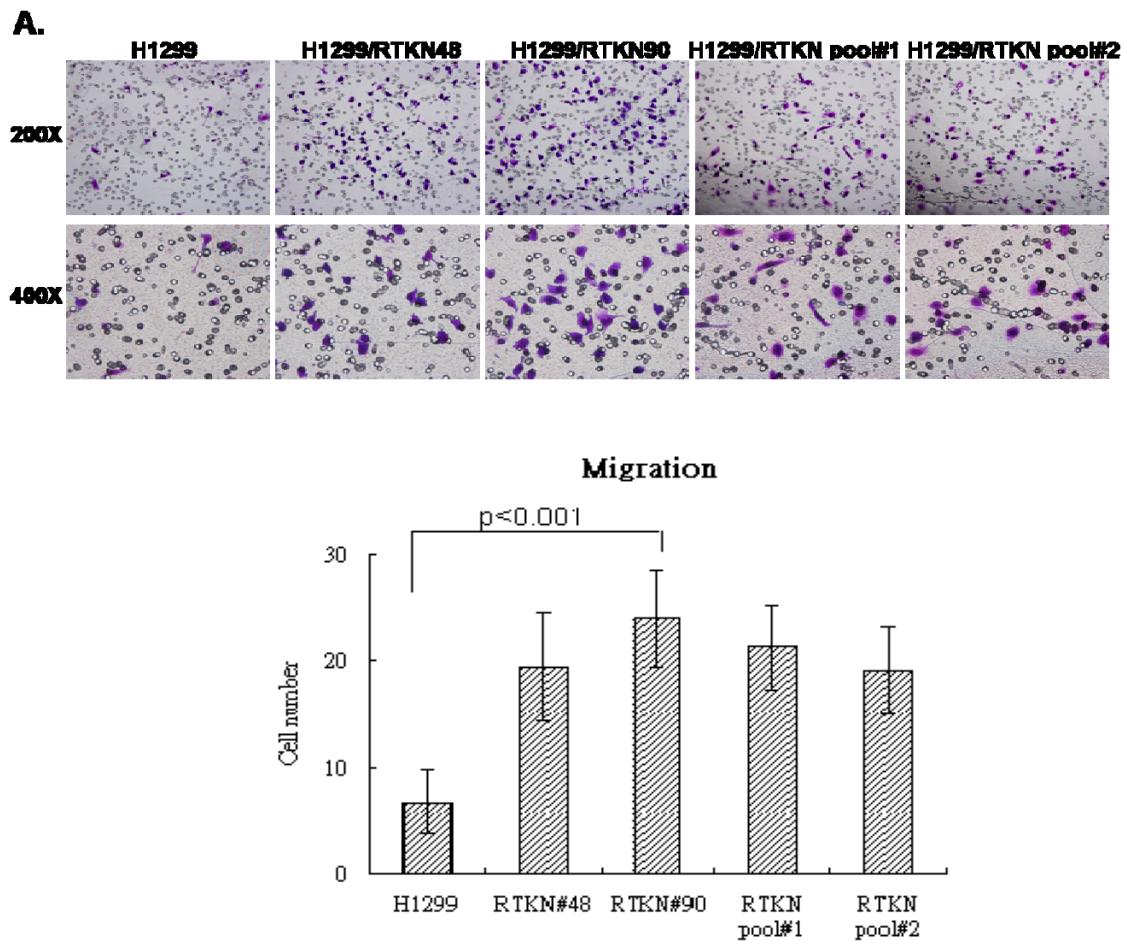






圖八、過度表現 RTKN 所引起之細胞型態改變以及細胞骨架重整。

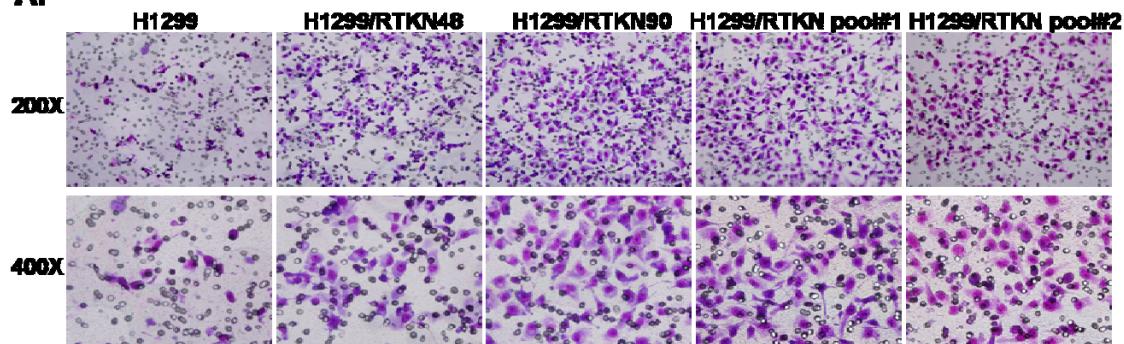
將 H1299/RTKN 穩定細胞株 (A) RTKN 低表現量之穩定細胞株；(B) RTKN 高表現量之穩定細胞株；(C) 混合表現 RTKN 的穩定細胞株 (pooled stable clone) 種在 24 孔盤中，每孔種 4×10^4 個細胞，24 小時後進行免疫螢光染色。RTKN (以 Flag 標記，並以紅色螢光染 Flag) 及 actin (以綠色螢光之 Phalloidin-FITC 染色)。



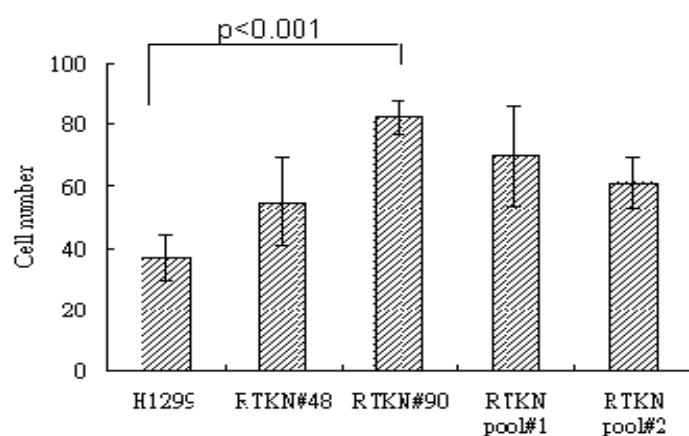
圖九、過度表現 RTKN 增加 H1299 細胞遷移(Migration)之能力。

利用Boyden chamber(8 μm 孔徑)之方法模擬細胞存在的環境，來測定RTKN過度表對於細胞遷移(Migration)之影響。將細胞於0.1%血清培養液中稀釋成 3×10^5 cells/ ml種植於上層chamber中，在下層chamber裡給予含有1.0%血清之培養液，並於中間夾層面對下層chamber之表面塗上纖維粘連蛋白(fibronectin)。置於培養箱4小時後，收取chamber進行固定並染色。計算每個區域的細胞數並做成圖表，每次實驗為八重複，此統計結果為三次之獨立實驗。(A)染色後之照相結果；(B)照相後計數之統計結果。

A.

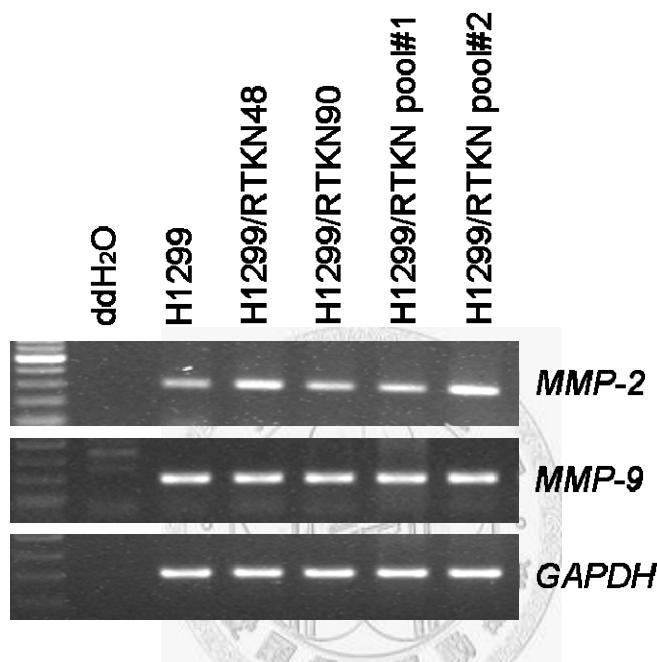


Invasion



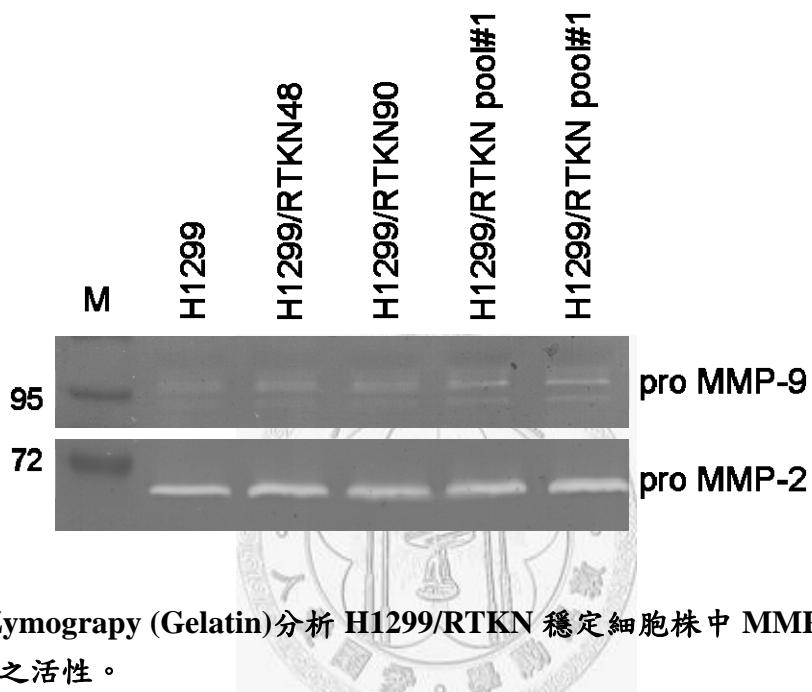
圖十、過度表現 RTKN 增加 H1299 細胞入侵(Invasion)之能力。

利用 Boyden chamber(8 μm 孔徑)之方法模擬細胞存在的環境，來測定 RTKN 過度表對於細胞入侵(Invasion)之影響。將細胞於 0.1% 血清培養液中稀釋成 3×10^5 cells/ ml 種植於上層 chamber 中，在下層 chamber 裡給予含有 0.2% 血清之培養液，中間夾上已塗上纖維粘連蛋白 (fibronectin) 及骨膠原 (Matrigel)的濾膜。置於培養箱 18 小時後，收取 chamber 進行固定並染色。計算每個區域的細胞數並做成圖表，每次實驗為八重複，此統計結果為三次之獨立實驗。(A)染色後之照相結果；(B)照相後計數之統計結果。



圖十一、H1299/RTKN 穩定細胞株中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 之表現情形。

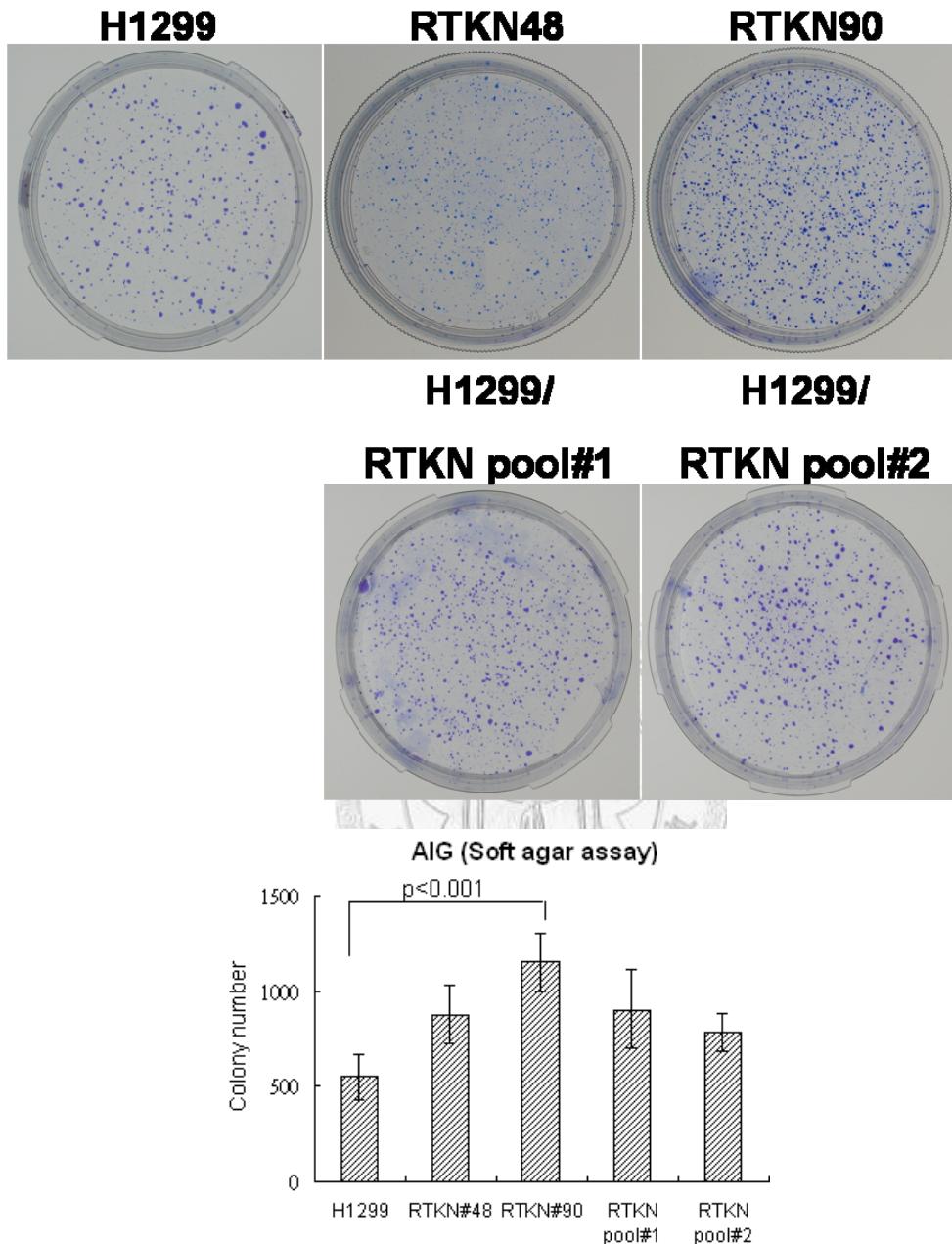
將 H1299/RTKN 穩定細胞株種植在 10 公分之細胞培養皿中，至細胞長滿後以 Trizo 收取細胞並進行 RNA 萃取後再進行反轉錄，將所得之 cDNA 利用 MMP-2 以及 MMP-9 之 primer 進行 PCR，觀察各 RTKN 穩定細胞株中之 MMP-2 以及 MMP-9 表現量。其中以 GAPDH 做為 mRNA 定量之對照組。



圖十二、Zymography (Gelatin) 分析 H1299/RTKN 穩定細胞株中 MMP-2 和 MMP-9 之活性。

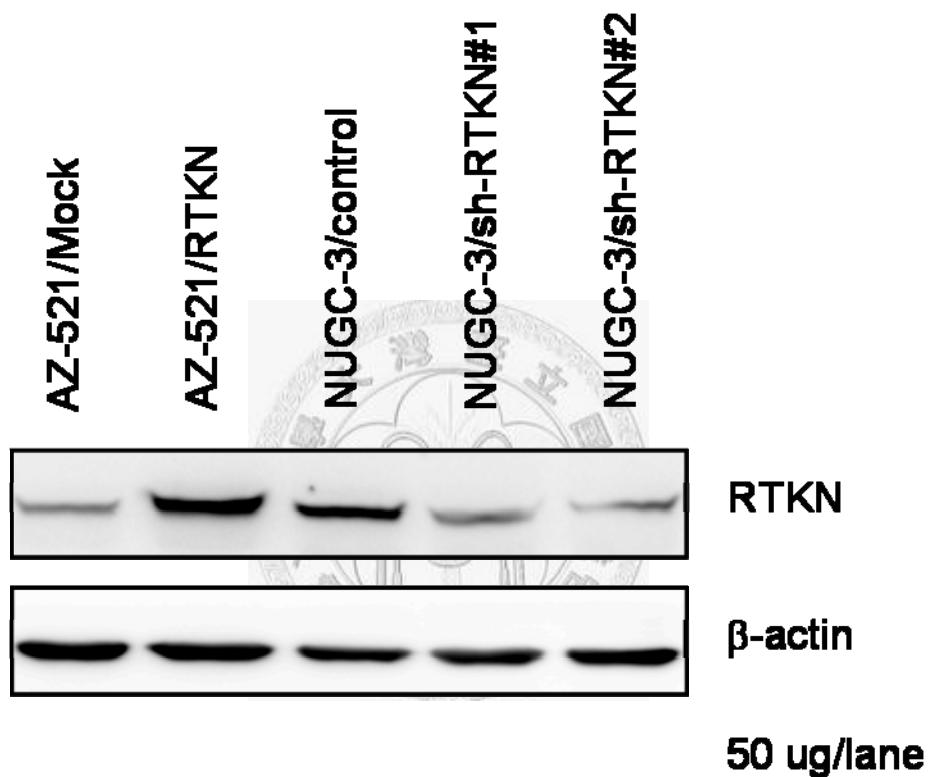
利用 microcon column 濃縮上清液。加入 2X sample buffer，進行膠片電泳。此膠片為含有 0.1% 的明膠 (gelatin)。電泳完成後，取下膠片置於 denaturing buffer 與 development buffer。使用 Coomassie Blue 染色後再褪色。上圖為掃瞄褪染後的膠片，成負片效果後所的圖片。分子量位於 68 Kd 為 MMP-2 之酶原 (proenzyme)，而大約位於 95 Kd 為 MMP-9 之酶原。

A.



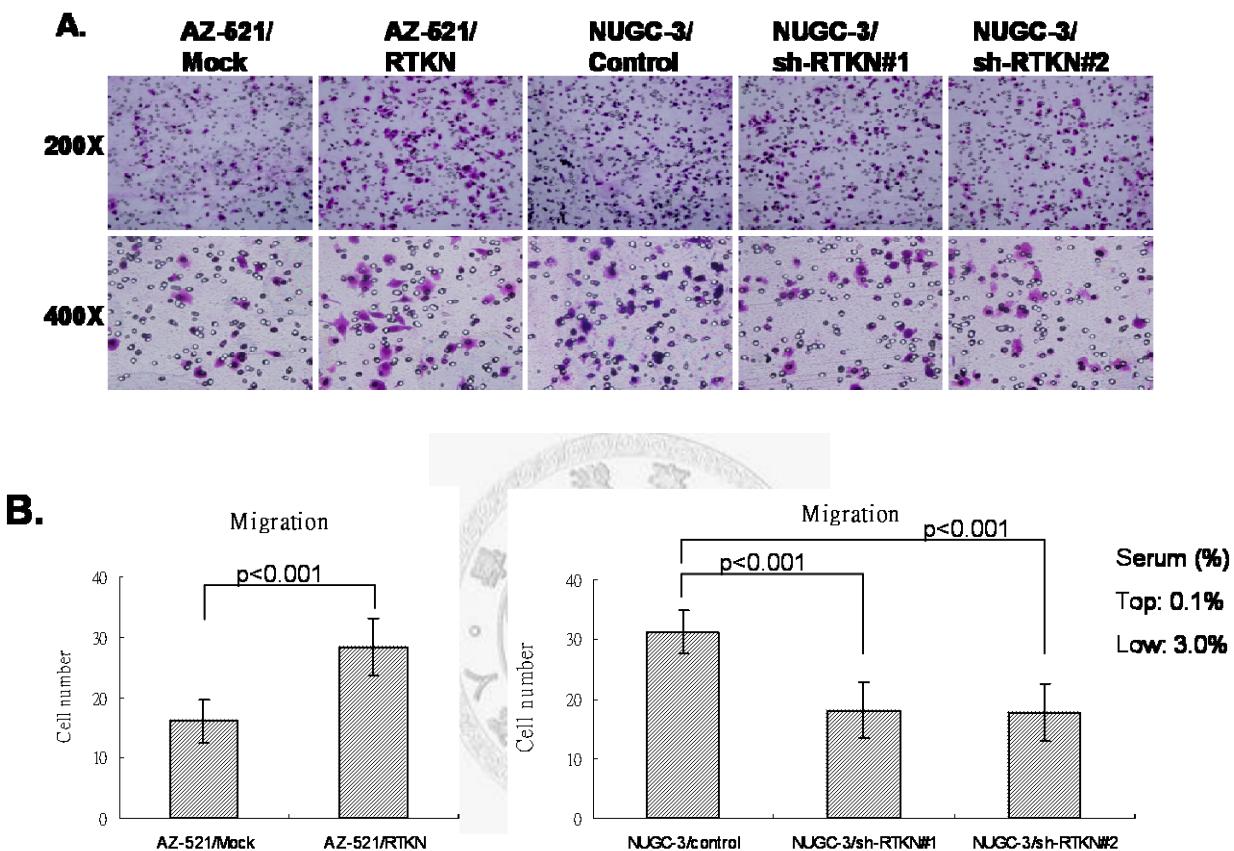
圖十三、過度表現 RTKN 可增加 H1299 細胞株在洋菜軟膠培養基上之非依賴性固著生長。

利用洋菜軟膠培養基測試(Soft agar assay)，分析其非依賴固著性生長能力 (anchorage-independent growth)。將各種表現 RTKN 之 H1299 穩定細胞株懸浮於 0.3% agarose medium 混合液，待上層膠凝固後，放入 37°C 培養箱內。隔天，於每一盤中加入 2 ml 培養液，培養 21 天，每隔 3 天更換一次培養液。21 天後，將細胞取出，靜置使其洋菜軟膠脫水乾燥，再以結晶紫染劑(crystal violet, 0.1% in 10% methanol) 染色，照相。(A)染色後之照相結果；(B)照相後計數之統計結果。



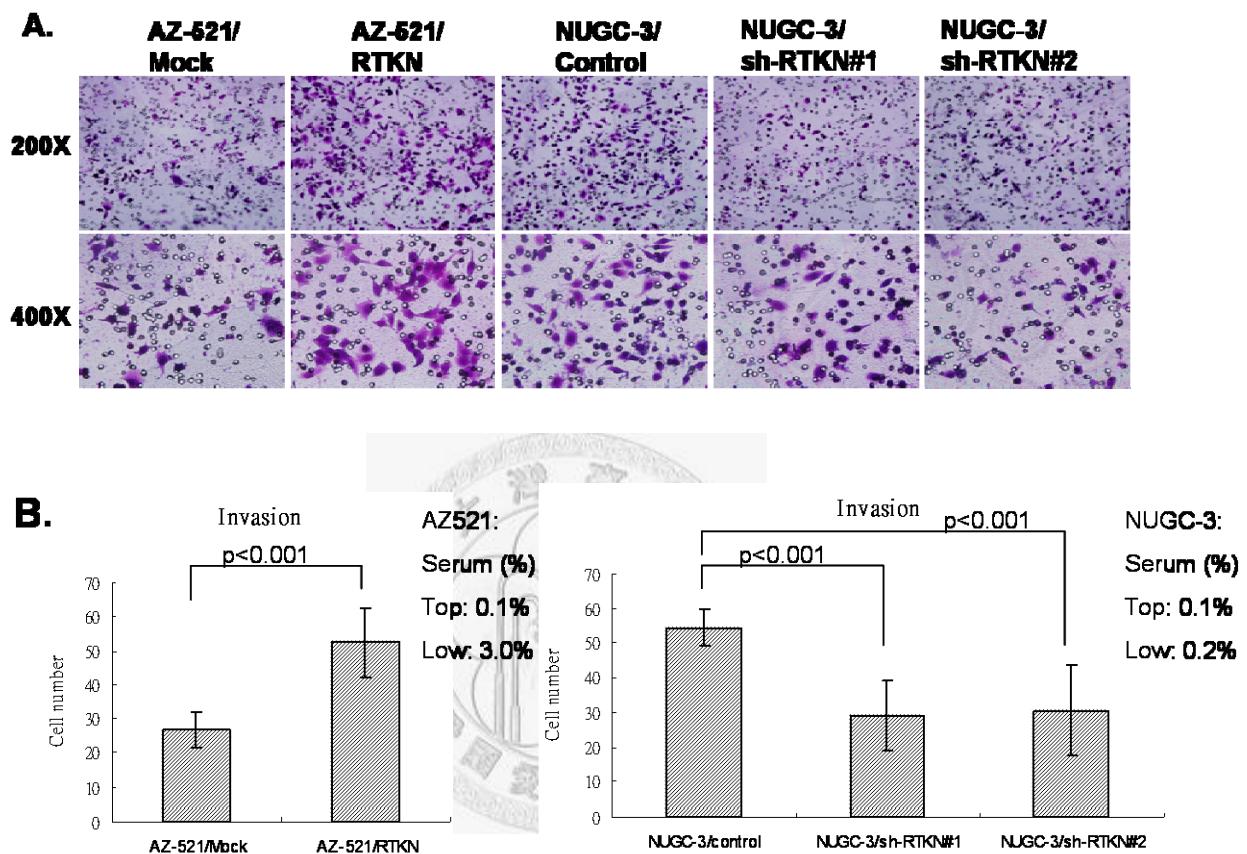
圖十四、AZ-521 及 NUGC-3 穩定細胞株(stable clone)中 RTKN 之表現量。

以細胞溶解緩衝液溶解 AZ-521 及 NUGC-3 穩定細胞株(stable clone)，並收
取蛋白質。利用西方墨點法辨識 RTKN 之專一性抗體測試細胞所含的內生
性 RTKN 之含量。並以 β -actin 做為蛋白質定量之對照組。



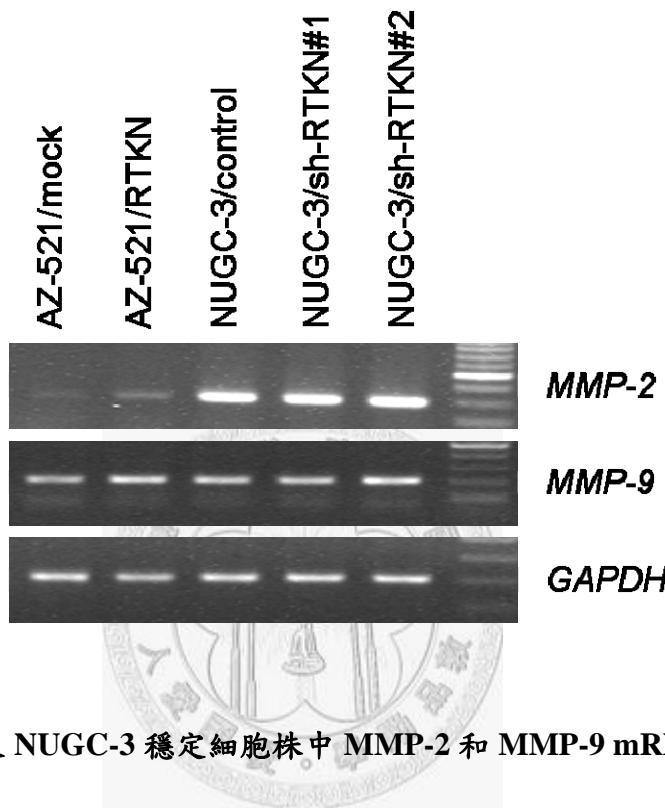
圖十五、胃癌細胞株中 RTKN 含量改變影響細胞遷移(Migration)之能力。

利用 Boyden chamber(8 μm 孔徑)之方法模擬細胞存在的環境，來測定 RTKN 過度表對於細胞遷移(Migration)之影響。將細胞於 0.1% 血清培養液中稀釋成 $3 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 種植於上層 chamber 中，在下層 chamber 裡給予含 3.0% 血清之培養液，並於中間夾層面對下層 chamber 之表面塗上纖維粘連蛋白 (fibronectin)。置於培養箱 4 小時後，收取 chamber 進行固定並染色。計算每個區域的細胞數並做成圖表，每次實驗為八重複，此統計結果為三次之獨立實驗。(A)染色後之照相結果；(B)照相後計數之統計結果。



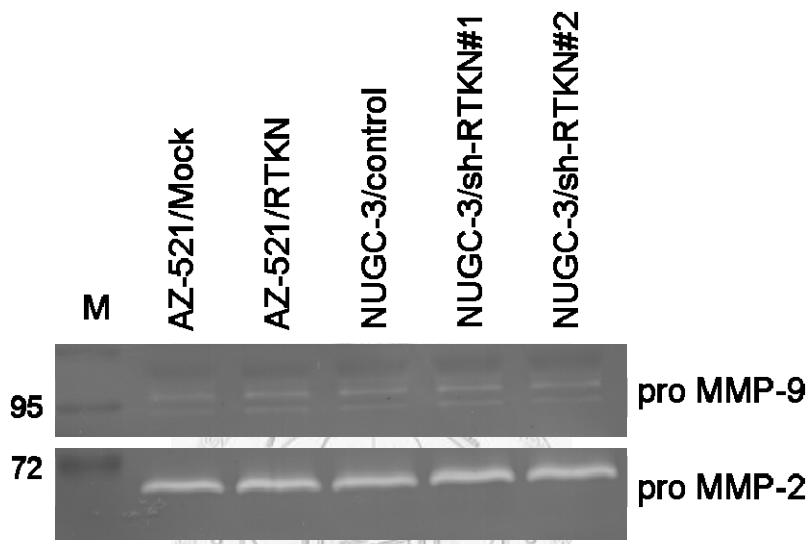
圖十六、胃癌細胞株中 RTKN 含量改變影響細胞入侵(Invasion)之能力。

利用 Boyden chamber(8 μm 孔徑)之方法模擬細胞存在的環境，來測定 RTKN 過度表對於細胞入侵(Invasion)之影響。將細胞於 0.1% 血清培養液中稀釋成 3×10^5 cells/ ml 種植於上層 chamber 中，在下層 chamber 裡給予含有 3.0%(AZ521)，0.2%(NUGC)血清之培養液，中間夾上已塗上纖維粘連蛋白(fibronectin) 及骨膠原 (Matrigel)的濾膜。置於培養箱 18 小時後，收取 chamber 進行固定並染色。計算每個區域的細胞數並做成圖表，每次實驗為八重複，此統計結果為三次之獨立實驗。(A)染色後之照相結果；(B)照相後計數之統計結果。



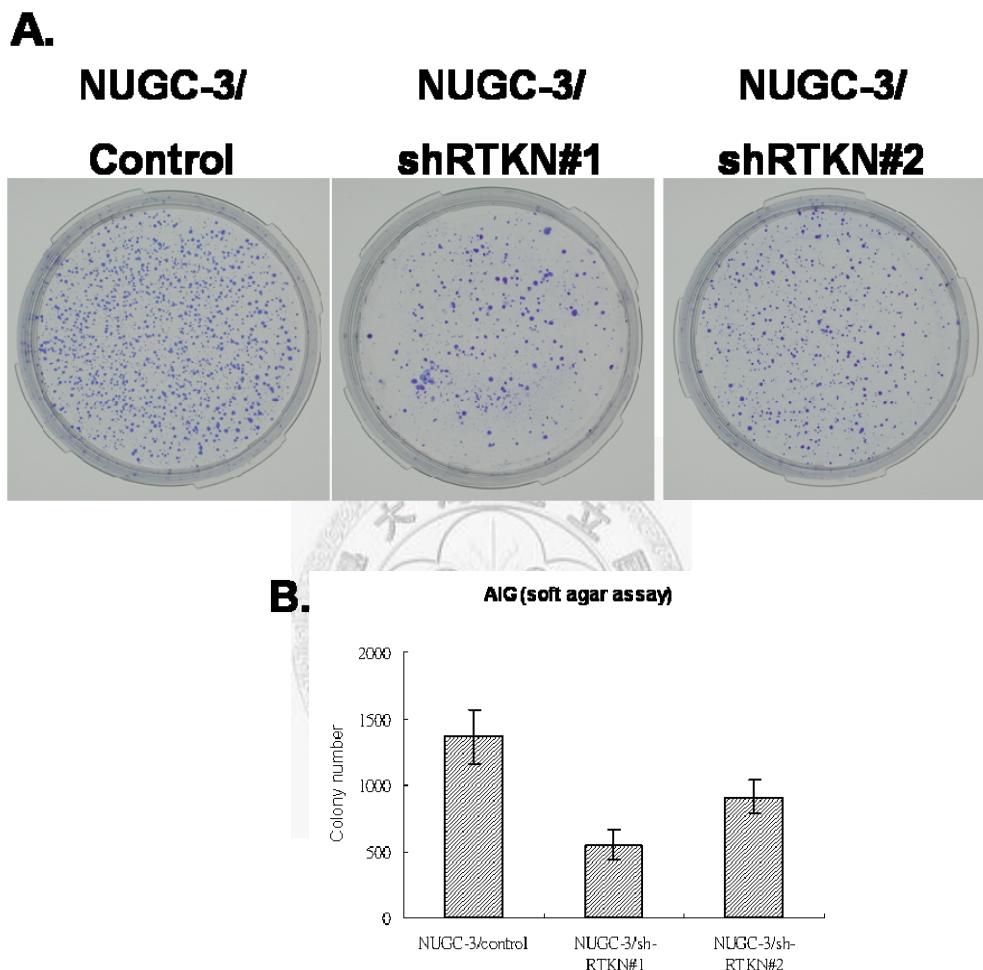
圖十七、AZ-521 及 NUGC-3 穩定細胞株中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 之表現情形。

將 RTKN 穩定細胞株種植在 10 公分之細胞培養皿中，至細胞長滿後以 Trizo 收取細胞並進行 RNA 萃取後再進行反轉錄，將所得之 cDNA 利用 MMP-2 以及 MMP-9 之 primer 進行 PCR，觀察各 RTKN 穩定細胞株中之 MMP-2 以及 MMP-9 表現量。其中以 GAPDH 做為 mRNA 定量之對照組。



圖十八、Zymography (Gelatin)分析 AZ-521 及 NUGC-3 穩定細胞株中 MMP-2 和 MMP-9 之活性。

利用 microcon column 濃縮上清液。加入 2X sample buffer，進行膠片電泳。此膠片為含有 0.1% 的明膠 (gelatin)。電泳完成後，取下膠片置於 denaturing buffer 與 development buffer。使用 Coomassie Blue 染色後再褪色。上圖為掃瞄褪染後的膠片，成負片效果後所的圖片。分子量位於 68 Kd 為 MMP-2 之酶原 (proenzyme)，而大約位於 95 Kd 為 MMP-9 之酶原。

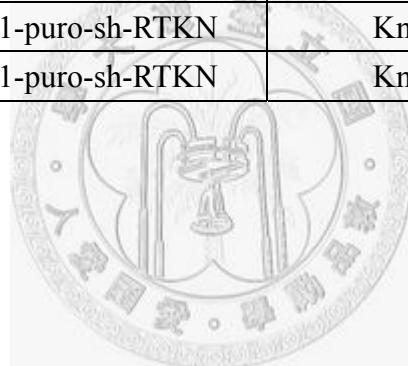


圖十九、抑制內生性之 RTKN 會減少細胞在洋菜軟膠培養基上長出的聚落數目。
 利用洋菜軟膠培養基測試(Soft agar assay)，分析其非依賴固著性生長能力(anchorage-independent growth)。將表現 RTKN 之穩定細胞株懸浮於 0.3% agarose medium 混合液，待上層膠凝固後，放入 37°C 培養箱內。隔天，於每一盤中加入 2 ml 培養液，培養 21 天，每隔 3 天更換一次培養液。21 天後，將細胞取出，靜置使其洋菜軟膠脫水乾燥，再以結晶紫染劑(crystal violet, 0.1% in 10% methanol) 染色，照相。(A)染色後之照相結果；(B)照相後計數之統計結果。

附錄

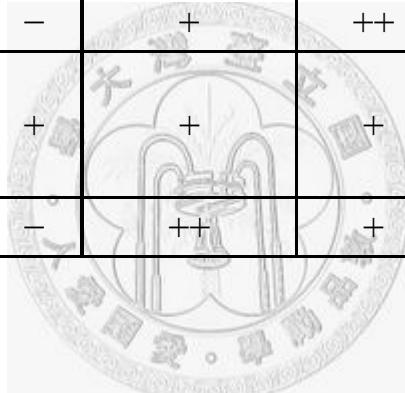
附表一、本研究所使用之質體 DNA

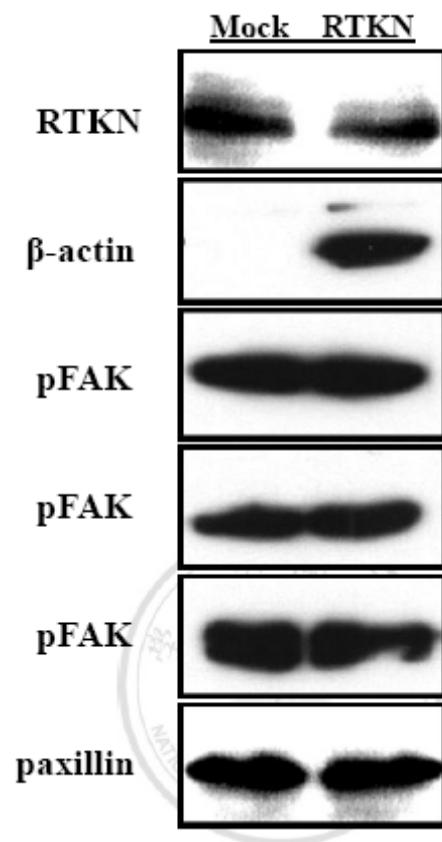
編號 (in JYC's lab)	內容	功能
J300	pCMV-Flag	Flag mock vector
J310	pcDNA3-HA	HA mock vector (含有 G418 selection marker)
J607	pCMV-Flag-RTKN	Express Flag-RTKN
J973	pcDNA3-HA-RTKN	Express HA-RTKN (含有 G418 selection marker)
J1342	pLKO.1-puro	Cloning vector of sh-RNA
J1350	pLKO.1-puro-sh-RTKN	Knock down of RTKN
J1352	pLKO.1-puro-sh-RTKN	Knock down of RTKN



附表二、H1299/RTKN 穩定表現細胞株之特性

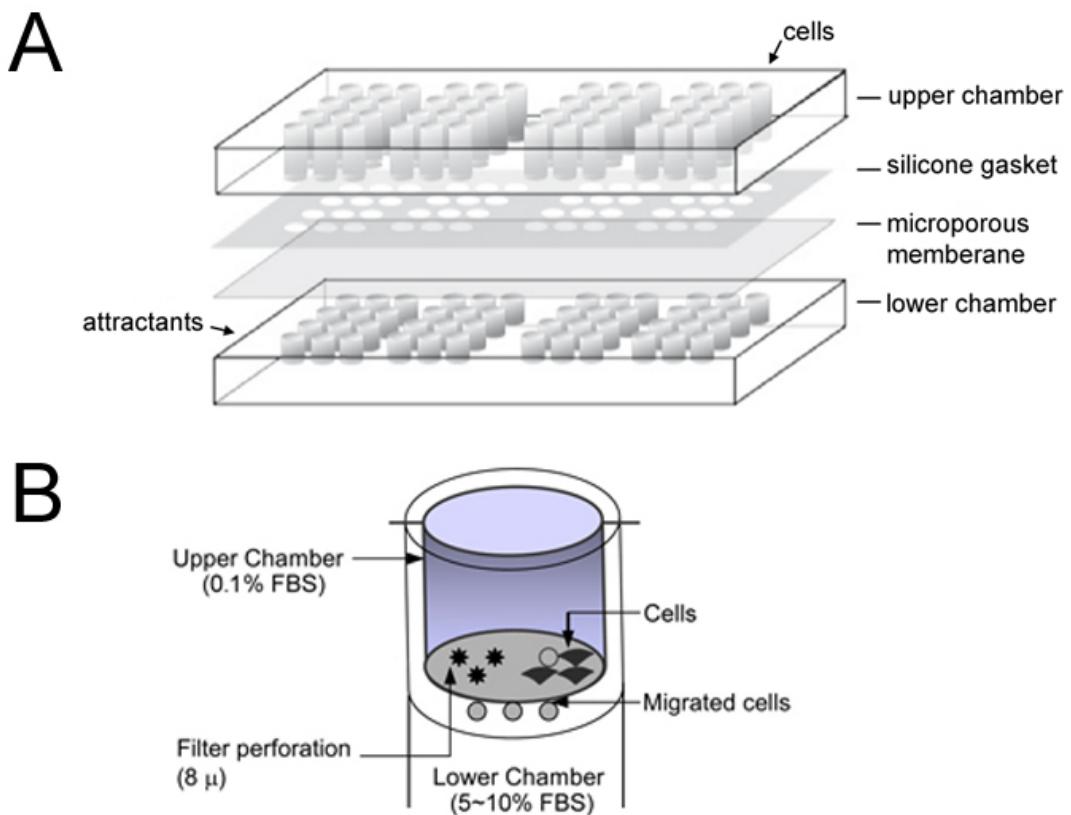
		Phalloidin			RTKN		
		Actin		Exp.	Location		
Cell clone	Morphology	Stress fiber	Lamellipodia	Filopodia	H/L	Lamellipodia	FA
H1299	Round	+	—	—			
Pool#1	Flat	+	+	—	Low	+	+
Pool#2	Flat	+	+	—	Low	+	+
RTKN#8	Round	—	++	—	Low	++	—
RTKN#48	Flat	—	++	+	Low	+++	—
RTKN#53	Round	—	+	++	Low	+	—
RTKN#90	Round	—	+	++	High	+	+
RTKN#7	Flat/ membrane protrusion	+	+	+	High	+	+++
RTKN#33	Round	—	++	+	High	++	+





附圖一、RTKN過度表現不影響組成粘著斑蛋白質之表現。

RTKN之過度表現，對粘著斑蛋白質(focal adhesion proteins，如focal adhesion kinase (FAK)、vinculin、paxillin等)表現量之影響。利用電穿孔分別將質體pFlag-mock及pFlag-RTKN轉染H1299細胞，24小時後以細胞溶解緩衝溶液萃取細胞蛋白質並測量蛋白質濃度，再分別以辨識Flag、focal adhesion kinase(FAK)、vinculin、paxillin等抗體進行西方墨點法。其中以 β -actin作為蛋白質定量之對照組。



附圖二、Boyden chamber 結構示意圖。

(A) 標準48洞 chemotaxis chamber，包括上下層 chamber、矽樹脂襯墊 (silicone gasket)、多孔濾膜 (microporous membrane)。從 H. C. Chen, *Methods Mol Biol* 294, 15 (2005) 摘錄。(B) 放大單孔 Boyden chamber 示意圖。上層加入細胞，細胞數固定為 3×10^5 cells/ml 散佈在0.1%血清的細胞培養液中，下層可以根據不同細胞特性給予從5%~10%血清，甚至更低濃度血清。從 K. M. Tchou-Wong *et al.*, *BMC Cancer* 6, 151 (2006) 摘錄。